

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Estudo fitoquímico da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* e comparação da atividade antioxidante com outras espécies do gênero *Baccharis***

Silvania Cláudia da Silva Luz

Florianópolis, 2003

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Estudo fitoquímico da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* e comparação da atividade antioxidante com outras espécies do gênero *Baccharis***

Dissertação apresentada por  
Silvania Cláudia da Silva Luz  
para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel  
CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa



# Agradecimentos

Agradeço a DEUS pelo dom da vida!

Ao prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, agradeço pela sua orientação, carinho, amizade, dedicação, incentivo e principalmente pela enorme contribuição em minha formação científica e profissional.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, agradeço a co-orientação, amizade e dedicação.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mareni Rocha Farias, agradeço pela oportunidade em iniciar o trabalho em pesquisa e pela colaboração em meu trabalho de mestrado.

À aluna de doutorado Viviane Silva Pires, pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao meu marido Luís Felipe, pelo seu apoio incondicional, carinho, respeito, dedicação e paciência.

Aos meus pais, irmãs e cunhado, que mesmo longe se fazem sempre presentes em minha vida, agradeço o apoio e o carinho.

Aos meus sogros, agradeço o apoio.

Ao amigo Nagami, pelo incentivo na pesquisa.

À amiga Beatriz, agradeço a dedicação, amizade e disponibilidade em ajudar-me nas horas de maior sufoco.

Ao amigo Luciano que participou do início do meu trabalho em pesquisa, agradeço pela contribuição, amizade e incentivo.

Aos amigos Rodrigo, Cintia, Theófilo, Marcelo, Adriana, Daniela, Juliana pela disponibilidade em ajudar-me quando eu mais precisei....

À técnica do laboratório Solange, que mostrou ser uma “mãezona”, socorrendo nos apuros das aulas e cuidando das colunas.....obrigado pela dedicação e amizade.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Valeu!!!!!!!!!!!!!!

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
3.1	Aspectos gerais do gênero <i>Baccharis</i> .....	21
3.2	Aspectos botânicos .....	23
3.2.1	Aspectos botânicos: <i>B. uncinella</i> A. P. de Candolle .....	23
3.2.2	Aspectos botânicos: <i>B. trimera</i> (Less.) A. P. DC .....	24
3.2.3	Aspectos botânicos: <i>B. articulata</i> (Lam.) Pers .....	25
3.2.4	Aspectos botânicos: <i>B. microcephala</i> (Less.) A. P. de Candolle .....	26
3.2.5	Aspectos botânicos: <i>B. spicata</i> (Lam.) Baillon .....	27
3.2.6	Aspectos botânicos: <i>B. usterii</i> Heering .....	28
3.3	Aspectos etnofarmacológicos do gênero <i>Baccharis</i> .....	29
3.4	Toxicidade do gênero <i>Baccharis</i> .....	30
3.5	Aspectos químicos do gênero <i>Baccharis</i> .....	31
3.6	Aspectos biológicos e farmacológicos .....	35
3.7	Cera epicuticular .....	37
3.8	Atividade antioxidante .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.1	Equipamentos usados .....	54
4.1.1	Equipamentos para análise espectroscópica .....	54
4.1.2	Equipamentos para análise de atividade antioxidante .....	54
4.1.3	Procedimentos gerais .....	54
4.2	Material vegetal .....	55
4.3	Preparação dos extratos .....	56
4.3.1	Análise fitoquímica .....	56
4.3.2	Análise atividade antioxidante .....	56
4.4	Fracionamento do extrato de <i>B. uncinella</i> A.P de Candolle para análise fitoquímica .....	57
4.5	Análise cromatográfica .....	58
4.6	Isolamento da substância BU1 a partir do precipitado .....	58
4.7	Isolamento da substância BU2 a partir da fração acetato de etila .....	60
4.8	Isolamento das substâncias BU3, BU4 e BU5 partindo da fração diclorometano .....	62
4.8.1	Isolamento da BU3 .....	62
4.8.2	Isolamento da BU4 .....	63
4.8.3	Isolamento da BU5 .....	63

<b>4.9</b>	<b>Reação de Libermann-Burchard.....</b>	<b>65</b>
<b>4.10</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante dos extratos acetônicos de <i>B. uncinella</i>, <i>B. articulata</i>, <i>B. trimera</i>, <i>B. usterii</i>, <i>B. microcephala</i> e <i>B. spicata</i>. ....</b>	<b>65</b>
4.10.1	Monitoramento do radical DPPH.....	65
4.10.2	Avaliação da peroxidação lipídica.....	66
4.10.2.1	Preparação de microssomas.....	66
4.10.2.2	Determinação da concentração de proteínas.....	67
4.10.2.3	Avaliação da lipoperoxidação induzida por radical ascorbila em microssomas de fígado de rato.....	68
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Rendimentos dos extratos.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise cromatográfica das frações de <i>B. uncinella</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise estrutural das substâncias isoladas .....</b>	<b>75</b>
5.3.1	Substância BU1.....	75
5.3.1.1	Análise espectroscópica no Infravermelho.....	75
5.3.1.2	Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU1A.....	77
5.3.2	Análise da substância BU3.....	87
5.3.2.1	Análise espectroscópica no Infravermelho da substância BU3 .....	87
5.3.2.2	Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU3. ....	89
5.3.3	Análise da substância BU2.....	101
5.3.3.1	Análise do espectro Ultravioleta da substância BU2 .....	101
5.3.3.2	Análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU2.....	105
5.3.4	Análise da substância BU4.....	115
5.3.4.1	Análise do espectro ultravioleta da substância BU4.....	115
5.3.5	Análise da substância BU5.....	119
5.3.5.1	Análise do espectro de ultravioleta da substância BU5.....	119
5.3.5.2	Análise de espectroscopia de RMN - <sup>13</sup> C da cera epicuticular.....	122
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante dos extratos acetônicos de <i>B. uncinella</i>, <i>B. spicata</i>, <i>B. usterii</i>, <i>B. microcephala</i>, <i>B. trimera</i> e <i>B. articulata</i> .....</b>	<b>126</b>
5.4.1	Análise da atividade antioxidante dos extratos acetônicos frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina).....	126
5.4.2	Análise da atividade antioxidante dos extratos acetônicos das espécies de <i>Baccharis</i> frente à peroxidação lipídica induzida por radical ascorbila.....	129
<b>5.5</b>	<b>Discussão dos resultados da atividade antioxidante.....</b>	<b>131</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>142</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Foto do ramo de <i>Baccharis uncinella</i> .....	24
Figura 2: Foto do ramo de <i>Baccharis trimera</i> .....	25
Figura 3: Foto do ramo de <i>Baccharis articulata</i> . ....	26
Figura 4: Foto do ramo de <i>Baccharis microcephala</i> . ....	27
Figura 5: Foto do ramo de <i>Baccharis spicata</i> . ....	28
Figura 6: Foto do ramo de <i>Baccharis usterii</i> . ....	29
Figura 7: Estruturas de diterpenos das espécies de <i>Baccharis articulata</i> e <i>Baccharis trimera</i> . ....	33
Figura 8: Flavonóides isolados de espécies do gênero <i>Baccharis</i> . ....	34
Figura 9: Esquema representativo da cutícula dos vegetais .....	37
Figura 10: Foto da membrana celular caracterizando a cera epicuticular no vegetal .....	38
Figura 11: Esquema demonstrando estado de ativação do oxigênio. ....	44
Figura 12: Figura representativa da bicamada lipídica. ....	47
Figura 13: Esquema representativo das reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica envolvendo o radical hidroxila.....	48
Figura 14: Esquema representativo do mecanismo do início e da propagação da peroxidação lipídica envolvendo o radical ascorbila.....	50
Figura 15: Esquema de fracionamento do extrato acetônico de <i>Baccharis uncinella</i> . ....	58
Figura 16: Isolamento da substância BU1. ....	59
Figura 17: Isolamento da substância BU2 .....	61
Figura 18: Isolamento da substância BU3. ....	62
Figura 19: Esquema de isolamento da substância BU4. ....	63
Figura 20: Esquema de isolamento da substância BU5. ....	64
Figura 21: Análise cromatográfica das frações obtidas da partição de <i>Baccharis uncinella</i> – revelação com Reagente natural A .....	73
Figura 22: Análise cromatográfica das frações obtidas da partição de <i>Baccharis uncinella</i> – revelação com anisaldeído sulfúrico.....	74
Figura 23: Espectro de infravermelho da substância BU1A em KBr.....	76
Figura 24: Espectro de RMN - <sup>13</sup> C totalmente desacoplado da substância BU1A.....	78
Figura 25: Espectro de RMN - DEPT da substância BU1A. ....	79
Figura 26: Estrutura da substância BU1A - ácido ursólico.....	82
Figura 27: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância BU1A. ....	83
Figura 28: Espectro de correlação de RMN CH-COSY (HMQC) da substância BU1A. ....	84

Figura 29: Espectro de correlação RMN HH – Cosy da substância BU1A. ....	85
Figura 30: Análise cromatográfica do precipitado da cera epicuticular de <i>Baccharis uncinella</i> frente a substância autêntica de ácido ursólico. ....	86
Figura 31: Espectro de Infravermelho da substância BU3 em KBr. ....	88
Figura 32: Espectro RMN - $^{13}\text{C}$ totalmente desacoplado da substância BU3. ....	90
Figura 33: Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ ampliado da substância BU3. ....	91
Figura 34: Espectro RMN - DEPT da substância BU3. ....	92
Figura 35: Espectro RMN - $^1\text{H}$ da substância BU3. ....	93
Figura 36: Espectro RMN - $^1\text{H}$ da substância BU3 ampliado na região entre $\delta_{\text{H}}$ 3,0 e $\delta_{\text{H}}$ 5,0. ....	94
Figura 37: Espectro RMN - $^1\text{H}$ da substância BU3 ampliado na região entre $\delta_{\text{H}}$ 0 e $\delta_{\text{H}}$ 2,4. ....	95
Figura 38: Espectro RMN - CH Cosy (HMQC) da substância BU3. ....	96
Figura 39: Espectro RMN - CH Cosy (HMQC) ampliado da substância BU3. ....	97
Figura 40: Estruturas dos triterpenos do tipo $\Delta^5$ e $\Delta^3$ amirina. ....	99
Figura 41: Análise cromatográfica da substância BU3. ....	100
Figura 42 : Espectros de ultravioleta da substância BU2. ....	104
Figura 43: Análise cromatográfica do isolamento da substância BU2. ....	107
Figura 44: Esquema representativo de cromatografia em camada delgada das substâncias BU2 e BU5 frente a substâncias autênticas, cirsimaritina e xantomicol. ....	108
Figura 45: Estrutura da substância BU2 – Cirsimaritina. ....	108
Figura 46: Espectro RMN - $^1\text{H}$ da substância BU2. ....	110
Figura 47: Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da substância BU2 – ampliado. ....	111
Figura 48: Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ desacoplado da substância BU2. ....	112
Figura 49: Espectro RMN $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ Cosy da substância BU2. ....	113
Figura 50: Espectro RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Cosy da substância BU2. ....	114
Figura 51: Análise cromatográfica da substância BU4. ....	117
Figura 52: Espectros de ultravioleta da substância BU4. ....	118
Figura 53: Estrutura da substância BU5 - xantomicol. ....	120
Figura 54: Análise cromatográfica do isolamento da substância BU5. ....	120
Figura 55: Espectro de ultravioleta da substância BU5. ....	121
Figura 56: Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ da cera epicuticular de <i>Baccharis uncinella</i> . ....	124
Figura 57: Espectro RMN- $^1\text{H}$ da cera epicuticular de <i>Baccharis uncinella</i> . ....	125
Figura 58: Efeito da quercetina frente ao radical livre DPPH. ....	127
Figura 59: Efeito dos extratos de <i>Baccharis</i> sobre o radical DPPH. ....	128

Figura 60: Efeito dos extratos acetônicos das espécies de <i>Baccharis</i> na peroxidação lipídica induzida por radical ascorbila .....	130
Figura 61: Esquema da camada lipídica dos microssomas.....	135
Figura 62: Análise cromatográfica das espécies de <i>Baccharis</i> : <i>B. uncinella</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. microcephala</i> , <i>B. spicata</i> , <i>B. trimera</i> e <i>B. usterii</i> - utilizadas para teste de atividade antioxidante. ....	138
Figura 63: Análise cromatográfica das espécies de <i>Baccharis</i> : <i>B. uncinella</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. microcephala</i> , <i>B. spicata</i> , <i>B. trimera</i> e <i>B. usterii</i> e das substâncias isoladas do extrato acetônico de <i>B. uncinella</i> .....	139

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Baccharis</i> usadas na medicina popular.....	29
Tabela 2: Constituintes da cera epicuticular de algumas espécies vegetais. ....	39
Tabela 3: Espécies reativas de oxigênio . ....	44
Tabela 4: Concentrações de extratos acetônicos de espécies de <i>Baccharis</i> usadas no ensaio de DPPH. ....	66
Tabela 5: Concentrações dos extratos acetônicos, das espécies de <i>Baccharis</i> , usadas no ensaio de peroxidação lipídica. ....	69
Tabela 6: Rendimento do extrato acetônico de <i>Baccharis uncinella</i> .....	71
Tabela 7: Rendimento das frações da partição de <i>Baccharis uncinella</i> .....	71
Tabela 8: Rendimento da extração das espécies de <i>Baccharis</i> por imersão em acetona por 1 minuto .....	72
Tabela 9: Análise do espectro DEPT, caracterização dos tipos de carbonos.....	80
Tabela 10: Valores atribuídos aos carbonos da estrutura da substância BU1A, comparados com dados da literatura para o ácido ursólico.....	81
Tabela 11: Análise do espectro DEPT, definição das metilas, metilenos, metinos e carbono quaternário da substância BU3.....	89
Tabela 12: Valores de $^{13}\text{C}$ atribuídos a substância BU2 comparados com os valores atribuídos na literatura.....	109
Tabela 13: Deslocamentos químicos dos principais carbonos do ácido ursólico....	122
Tabela 14: Valores de $\text{IC}_{50}$ dos extratos acetônicos das diferentes espécies de <i>Baccharis</i> no ensaio DPPH. ....	127
Tabela 15: Valores de $\text{IC}_{50}$ dos extratos acetônicos das diferentes espécies de <i>Baccharis</i> no ensaio de peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbila..	131



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

Ac Et .....	Acetato de etila
CCD .....	Cromatografia em camada delgada
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	Diclorometano
DAM.....	Dialdeídomalônico
DEPT .....	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO .....	Dimetilsulfóxido
EP .....	Éter de petróleo
IV .....	Infravermelho
MeOH .....	Metanol
NaOAc .....	Acetato de sódio
NaOMe .....	Metóxido de sódio
NP .....	Reagente natural A
TBA.....	Ácido tiobarbitúrico
TP .....	Tampão Tris-HCl

## Resumo

*Baccharis uncinella* (Asteraceae) é uma espécie do gênero *Baccharis* popularmente conhecida como vassoura-lageana e na literatura há apenas um trabalho realizado sobre os constituintes voláteis presentes nas partes aéreas da planta. No presente estudo foi preparado um extrato acetônico da cera epicuticular das folhas de *B. uncinella* e foi investigado quanto a presença de flavonóides e terpenos. Desse extrato, foram isolados dois triterpenos e três flavonóides. O triterpeno majoritário foi identificado como ácido ursólico, através de análise espectroscópica (UV, IV, NMR) e comparação com amostra autêntica. Dos flavonóides, dois puderam ser identificados como cirsimarina e xantomicrol através de espectroscopia no ultravioleta e comparação com amostra autêntica. As espécies de *Baccharis*, *B. uncinella* (BU), *B. articulata* (BA), *B. trimera* (BT), *B. microcephala* (BM), *B. spicata* (BSp) e *B. usterii* (BUs), foram analisadas quanto ao perfil cromatográfico, constatando-se a presença de terpenos e flavonóides. Essas espécies foram testadas quanto ao potencial antioxidante em ensaios com o radical DPPH e peroxidação lipídica. Nos ensaios de DPPH e peroxidação lipídica os extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* apresentaram os seguintes valores de IC<sub>50</sub>: BU: IC<sub>50</sub>=280,0 e 148,4 µg/mL; BA: IC<sub>50</sub>=550,0 e 520,0 µg/mL; BT: IC<sub>50</sub>=26,5 e 23,1 µg/mL; BM: IC<sub>50</sub>=32,0 e 42,4 µg/mL; BSp: IC<sub>50</sub>=306,0 e 241,0 µg/mL e BUs: IC<sub>50</sub>=253,7 e 187,6 µg/mL. Os valores das IC<sub>50</sub> comprovam a eficácia dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* em sequestrar o radical DPPH e proteger a membrana microssomal da peroxidação lipídica. Tais resultados são comparáveis à quercetina.

## Abstract

*Baccharis uncinella* is a *Baccharis* species which is commonly known as “*vassoura-lageana*”. There has only been one previous phytochemical report concerning the chemical volatile constituents of the aerial parts of the plant. The epicuticular wax, obtained by extraction by merging the entire leaves in acetone (1 minute) was fractionated, resulting in two triterpens and three flavonoids. The major triterpen was identified as ursolic acid, through spectroscopical analysis (UV, IR, NMR) and comparison with an authentic sample. Two of the three flavonoids could be identified as cirsimaritin and xantomicrol through UV spectroscopy and comparison with authentic samples. The species *B. uncinella*, *B. articulata*, *B. trimera*, *B. microcephala*, *B. spicata* e *B. usterii* species were analysed chromatographically and the presence of terpenes and flavonoids were found. The antioxidant potential of these species was tested through DPPH and lipidic peroxidation tests and the values that resulted for them are: BU: IC<sub>50</sub>=280,0 and 148,4 g/mL; BA: IC<sub>50</sub>=550,0 and 520,0 g/mL; BT: IC<sub>50</sub>=26,5 and 23,1 g/mL; BM: IC<sub>50</sub>=32,0 and 42,4 g/mL; BSp: IC<sub>50</sub>=306,0 and 241,0 g/mL and BUs: IC<sub>50</sub>=253,7 and 187,6 g/mL. These IC<sub>50</sub> values confirm the efficacy of the acetonic extracts of the *Baccharis* species in sequestering the DPPH radical and protecting the microsomal membrane from lipidic peroxidation. These results are comparable to the antioxidant activity of quercetin.



Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestação artística, cultural e religiosa e como meio restaurador da saúde. Nos dias atuais representam uma das fontes alternativas entre as diversas necessárias à existência da sociedade, e tem como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e controlável pelo gênio humano (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, com grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, muitas destas estruturas, sendo isoladas como modelos para síntese de fármacos. Apesar do aumento de estudos nessa área, estima-se que apenas de 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (GUERRA; NODARI, 2003).

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae é nativo e encontrado quase que com exclusividade na América. Abrange cerca de 400 espécies (ZARDINI, 1984a; ZARDINI, 1984b) e estima-se que apenas 10% destas tenham sido estudadas fitoquimicamente (GINER et al., 1986). No Brasil, espécies de *Baccharis* ocorrem desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (CORRÊA, 1984). No Rio Grande do Sul, estima-se um número superior a 70 espécies (BARROSO, 1976).

Algumas espécies de *Baccharis* são amplamente usadas pela população sendo conhecidas como carqueja, como exemplo *Baccharis trimera* é conhecida como carqueja amargosa é muito usada como estomáquica, anti-reumática e para problemas do fígado. Um outro exemplo é a *Baccharis articulata* conhecida como

carqueja doce usada principalmente como digestiva e amarga (CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986).

Na literatura existem muitas referências de estudos químicos e farmacológicos de *Baccharis genistelloides*; porém, essa denominação não é mais aceitável. O espécime constante da Farmacopéia Brasileira, 1ª Edição, é *Baccharis genistelloides* var. *trimera*. No entanto, o grupo de plantas denominado *Baccharis genistelloides* abrange as espécies *B. trimera*, *B. crispa*, *B. cylindrica*, *B. myriocephala* e *B. milleflora*, portanto a denominação *Baccharis genistelloides* é imprecisa.

O gênero *Baccharis* é conhecido por produzir numerosos sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, agliconas de flavonóides e substâncias tóxicas de estruturas diferenciadas como os tricotecenos (JARVIS et al., 1991; LIU et al., 1993; GIANELLO et al., 1999). Argandoña e Faini (1993) relatam a presença do ácido oleanólico em *B. linearis*, que é muito difundido nas partes aéreas de espécies do gênero *Baccharis*, assim como na cera epicuticular e galhos. Este ácido tem sido considerado como agente de defesa antimicrobiana devido à formação de barreira hidrofóbica.

Em se tratando dos constituintes da cera epicuticular de vários vegetais, onde esta exerce uma função protetora para a planta contra o ataque de agentes agressores, há relatos da presença de triterpenos (WOLLENWEBER et al., 1999); flavonóides (ALCERITO et al., 2002) e hidrocarbonetos (SKORUPA; SALATINO; SALATINO, 1998). No levantamento bibliográfico realizado, constatou-se poucos estudos com a cera epicuticular de espécies de *Baccharis*.

Algumas das espécies de *Baccharis* têm sido amplamente estudadas quanto às suas atividades farmacológicas, em especial a atividade antiinflamatória (GENÉ

et al, 1996; GIANELLO et al., 1999). Há também estudos relatando a toxicidade de algumas espécies como a *B. megapotamica* e *B. coridifolia*, que apresentam micotoxinas conhecidas como tricotecenos (HABERMEHL, 1985; JARVIS et al ., 1991).

A espécie de *Baccharis* proposta para este trabalho é *Baccharis uncinella*. A revisão bibliográfica realizada revelou que há um único estudo sobre os constituintes do óleo volátil, sendo assim, são necessários mais estudos sobre seus constituintes. A proposta principal deste trabalho foi o isolamento e a elucidação de substâncias da cera epicuticular. Também é objeto de estudo a verificação do potencial antioxidante da espécie *B. uncinella* e a comparação com as demais espécies (*B. articulata*, *B. trimera*, *B. microcephala*, *B. spicata* e *B. usterii*) visto que, no levantamento bibliográfico realizado, não foram encontrados trabalhos abordando esta propriedade na cera epicuticular. Dado que a cera epicuticular tem função de proteger o vegetal, levantou-se a hipótese de a cera possuir atividade antioxidante. Os testes realizados procuraram validar tal hipótese.





O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Isolar e identificar as substâncias majoritárias presentes na cera epicuticular de *B. uncinella*.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos acetônicos da cera epicuticular de *B. uncinella* e das seguintes espécies: *B. articulata*, *B. trimera*, *B. microcephala*, *B. usterii* e *B. spicata*, com a finalidade de comparar o poder antioxidante destas espécies vegetais.

---

### **3 Revisão Bibliográfica**

### 3.1 Aspectos gerais do gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis*, pertence à família Asteraceae. Esse é um gênero extenso, que abrange cerca de 400 espécies, além de nativo e quase exclusivo da América (ZARDINI, 1984a; ZARDINI, 1984b). No Brasil são descritas espécies de *Baccharis* nos estados do leste e do sul, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo que neste último estado estima-se a ocorrência de cerca de 70 espécies (BARROSO, 1976; ZARDINI, 1984a).

A taxonomia do gênero *Baccharis* foi descrita por Barroso (1973, 1976) e Barroso e Bueno (2002), sendo propostos 27 grupos de forma a reunir as espécies morfológicamente, geograficamente e taxonomicamente. Segundo este estudo, *Baccharis trimera* (Lers.) DC, pertence ao grupo TRIMERA, que inclui as seguintes espécies: *B. reginelli* Schultz Bipontinus, *B. vincaefolia* Baker, *B. milleflora* A. P de Candolle, *B. glazioui* Backer, *B. opuntioides* Martius, *B. articulata* (Lam.) Person, *B. gaudichaudiana* A. P. de Candolle, *B. usteri* Heering, *B. sagittalis* A. P. de Candolle, *B. crispa* Springel, *B. microcephala* (Less.) A. P. de Candolle, *B. cyllindrica* (Less.) A. P. de Candolle, *B. phyteumoides* (Less.) A. P. de Candolle, *B. stenocephala* Baker e *B. riograndensis* Teodore et Vidal.

Deve-se destacar as espécies *B. coridifolia* A. P. de Candolle e *B. patens* Baker, que pertencem ao grupo ERIGEROIDES; *B. anomala* A. P. de Candolle do grupo ANOMALA e *B. spicata* (Lam.) Bailon, *B. megapotamica* Sprengel, *B. dracunculifolia* A. P. de Candolle e *B. uncinella* A. P. de Candolle do grupo SPICATA (BARROSO, 1973; BARROSO, 1976).

Das espécies do gênero *Baccharis*, muitas já foram estudadas quimicamente. Em nossa flora há um número elevado de espécies muito

semelhantes, sendo algumas usadas na medicina popular indistintamente, sob o nome de “carqueja” (SIMÕES et al., 1986).

A denominação “carqueja” é comum para diversas espécies de *Baccharis*, sendo que para algumas são utilizadas ainda alguns adjetivos. Dentre o grupo TRIMERA as seguintes espécies são conhecidas pelo nome “vulgar” de carqueja: *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. gaudichaudiana*, *B. microcephala*, *B. stenocephala* e *B. trimera* (BARROSO, 1973; CORRÊA, 1984; BARROSO; BUENO, 2002). Zardini (1984a) cita as espécies *B. crispa*, *B. notoserghila* e *B. spicata* como plantas também conhecidas pelo nome de “carqueja”.

A espécie *B. trimera* além de ser conhecida como carqueja é também conhecida como “carqueja amargosa” (CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986; ALMEIDA, 1993; BARROSO; BUENO, 2002). Sua distribuição ocorre no Sul do Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai e Bolívia (CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986; BARROSO; BUENO, 2002).

A espécie *B. articulata* é também conhecida pelos sinônimos de carqueja doce e carquejinha, com ocorrência nas mesmas regiões citadas para *B. trimera* (CORRÊA, 1984).

Para as espécies de *B. microcephala* e *B. spicata*, a distribuição ocorre nas regiões do Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Estas espécies são popularmente conhecidas como carqueja e cambará (*B. microcephala*) e vassoura-da-folha-estreita (*B. spicata*) (BARROSO; BUENO, 2002).

Especificamente sobre *B. uncinella*, esta espécie é popularmente conhecida como vassoura e vassoura-lageana, e tem ocorrência comum no sudeste e sul do Brasil (BARROSO, 1976; FRIZZO et al. 2001; BARROSO; BUENO, 2002). Em Santa

Catarina tem sua distribuição quase que exclusiva no planalto, onde ocorre nos chamados campos sujos, bordas de capões, florestas secundárias ou mesmo sob pinheirais mais abertos (BARROSO; BUENO, 2002).

### **3.2 Aspectos botânicos**

As espécies do gênero *Baccharis* Linnaeus são subarbustos ou arbustos ramificados, com caule e ramos cilíndricos, afilos ou folhosos, mais ou menos angulosos e providos de alas foliáceas (BARROSO, 1976). A seguir são apresentadas fotos das espécies investigadas, bem como uma descrição sucinta de cada espécie com base nas descrições dos autores Barroso e Bueno (2002).

#### **3.2.1 Aspectos botânicos: *B. uncinella* A. P. de Candolle**

*B. uncinella* é um arbusto de ramos tomentosos a glabrescentes. As folhas são sésseis, de obovais a elípticas ou oblongas, com 6-15 mm de comprimento e 4-6mm de largura, com face inferior cinéreo tomentosa, margens revolutas, ápice obtuso, mucronulado, uninérveas. O capítulo apresenta-se com 20-40 flores; involúcro campanulado, com brácteas involucrais agudas e pilosas no dorso. A corola da flor feminina mostra-se com ápice laciniado e o aquênio com cerca de 1,5mm de comprimento. Essa espécie floresce preferencialmente nos meses de setembro a outubro, eventualmente florindo até março (Figura 1).



Figura 1: Foto do ramo de *Baccharis uncinella*.

### 3.2.2 Aspectos botânicos: *B. trimera* (Less.) A. P. DC.

*B. trimera* apresenta-se como um subartusto glabro, glutinoso, ramificado, com alas dos ramos com mais ou menos 0,5-1,5 cm de largura. As folhas são muito reduzidas e ovais; os capítulos geralmente são aglomerados, formando espigas interrompidas, que se ordenam em inflorescência paniculiforme, com ramificações simples. O involúcro do capítulo feminino apresenta 5-6 mm de altura e 2-3 mm de diâmetro, com 3-4 séries de brácteas involucrais glabras, agudas ou acurninadas. Os involúcros dos capítulos masculinos medem cerca de 4-5 mm de altura e 5mm de diâmetro, com brácteas involucrais ovadas e glabras. As flores apresentam-se com 30-40 mm, com corola de 3-4 mm de comprimento, com ápice truncado, envolvendo frouxamente o estilete (4-6 mm de comprimento) (Figura 2).



Figura 2: Foto do ramo de *Baccharis trimera*.

### 3.2.3 Aspectos botânicos: *B. articulata* (Lam.) Pers.

*B. articulata* caracteriza-se como um arbusto de 0,5-1m de altura, com ramos de alas articuladas formando artículos de 1-3 cm de comprimento, com extremidades arredondadas. Os capítulos são ordenados em panículas terminais, com ráque alada, articulada, com mais ou menos 15-20 cm de comprimento, ramos laterais da panícula com mais ou menos 12-15 cm de comprimento e os secundários também articulados com cerca de 3-5 cm de comprimento, geralmente as extremidades desses ramos de segunda ordem tem alas muito mais estreitas do que as da porção basal. Os capítulos possuem involúcro campanulado, com cerca de 3-4 mm de altura e 2,5-3 mm de diâmetro. A corola da flor feminina possui 2 mm de comprimento e 0,1 mm de diâmetro, a corola masculina apresenta-se com cerca de 3-3,5 mm de comprimento. Os estiletes possuem mais ou menos 4 mm de comprimento com ramos abertos. As flores são perfumadas. A florada costuma ser abundante e muito atrativa para insetos, chama a atenção pela coloração verde acinzentados dos ramos e pela abundância de flores amareladas (Figura 3).



Figura 3: Foto do ramo de *Baccharis articulata*.

#### **3.2.4 Aspectos botânicos: *B. microcephala* (Less.) A. P. de Candolle**

Apresenta-se como um subarbusto com cerca de 0,5-1 m de altura, com ramos trialados; alas estreitas, planas, com mais ou menos 1-3 mm de largura, contínuas na sua extensão. Os capítulos são sésseis, agrupados, dispostos em espigas terminais interrompidos, ordenados em inflorescência paniculiforme. Os involúcros dos capítulos com 3-4 mm de altura e 2-3 mm de diâmetro, possuem brácteas involucrais de bordos largos, hialinos e dorso glanduloso. As flores femininas, com cerca de 30-40 mm, possuem corola com cerca de 1,5 mm de comprimento. Os estiletes apresentam-se com cerca de 2,5-3 mm de comprimento; os aquênios com 0,5-1 mm de comprimento. As flores masculinas de 20-30, com corola de 3-3,5 mm de comprimento, com limbo dividido em lacínios triangulares. Os estiletes apresentam-se com 3-4 mm de comprimento com ramos abertos (Figura 4).





Figura 4: Foto do ramo de *Baccharis microcephala*.

### 3.2.5 Aspectos botânicos: *B. spicata* (Lam.) Baillon

*B. spicata* apresenta-se como um arbusto com cerca de 0,8-1,5 m de altura, ramos pilosos ou glabrescentes, sulcados. As folhas são opostas, de características espatuladas a oblongas, com pêlo nas duas faces, ápice obtuso a agudo, base atenuada e margens denteadas, com 3-4 cm de comprimento e 1 cm de largura. Os capítulos são sésseis, aglomerados na axila de brácteas curtas, ordenados no ápice de ramos paucifolhosos de uma inflorescência pouco ramificada. O nome *spicata* está relacionado com a disposição dos capítulos no ramo em forma de espiga. As flores de 4-5 mm em cada capítulo. O involúcro apresenta-se campanulado com 6-7 mm de altura e 5-6 mm de diâmetro, com 5-6 séries de brácteas involucrais de textura mais ou menos firme, com o dorso esverdeado, margens hialinas curtas, glabras. A corola da flor feminina apresenta-se com 4 mm de comprimento e da

masculina com 5-7 mm de comprimento. Popularmente conhecida como vassoura-da-folha-estreita (Figura 5).



Figura 5: Foto do ramo de *Baccharis spicata*.

### 3.2.6 Aspectos botânicos: *B. usterii* Heering

Caracteriza-se como um subarbusto ramificado com cerca de 0,5-1m de altura, ramos trialados, com alas planas, glabras, contínuas e com 0,5-1,5 cm de largura. As folhas são ovais, curtamente pecioladas, trinerveas, com 1,5 cm de comprimento e 0,5-1,5 cm de largura, de base cordiforme. Os capítulos são dispostos em ramos especiformes, ordenados em panículas amplas; os involúcros dos capítulos possuem 5-6 mm de altura e 3-4 mm de diâmetro, com brácteas involucrais glabras, agudas; flores de 50-80 (Figura 6).



Figura 6: Foto do ramo de *Baccharis usterii*.

### 3.3 Aspectos etnofarmacológicos do gênero *Baccharis*

Muitas espécies de *Baccharis* são amplamente utilizadas na medicina popular. Na Tabela 1 estão referenciadas indicações populares de algumas espécies do gênero *Baccharis*.

Tabela 1: Espécies do gênero *Baccharis* usadas na medicina popular.

Espécie	Indicações Populares
<i>B. articulata</i>	Amarga, digestiva, febrífuga e diurética (MOREIRA, 1978; CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986); anti-séptica (ZARDINI 1984a; ADZET et al., 1991), tônica, dispepsias, anemia, antihipertensiva (CORRÊA, 1984).
<i>B. crispa</i>	Antiespasmódica, digestiva, estimulante, febrífuga, hepática, anti-reumática (ZARDINI, 1984a), desinfetante de feridas e úlceras e, na Argentina, estimulante da fertilidade feminina (GUPTA, 1995);

	ADZET et al., 1991).
<i>B. gaudichaudiana</i>	Hepática, digestiva, antiinflamatória de uso externo (ZARDINI, 1984a).
<i>B. microcephala</i>	Hepática, digestiva e para lavar feridas infectadas (ZARDINI, 1984a).
<i>B. notoserghilla</i>	Anti-diarreica e contra reumatismo (CORRÊA, 1984); tratamento pós-parto (ZARDINI, 1984a).
<i>B. stenocephala</i>	tônica, febrífuga e sucedânea do lúpulo na fabricação da cerveja (CORRÊA, 1984).
<i>B. trimera</i>	Tônica, estomáquica, amarga e estimulante do apetite, anti-helmíntica, diurética, anti-reumática, para combater anemia, cálculos biliares, má circulação do sangue, diarreia, vermes intestinais, inflamação das vias urinárias, externamente usada no tratamento de feridas e ulcerações, (CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986).

---

### 3.4 Toxicidade do gênero *Baccharis*

A espécie do gênero *Baccharis* que apresenta maior destaque quanto à sua toxicidade é *B. coridifolia* DC., que é conhecida há muito tempo. Hoehne (1978) relatou que sua toxicidade é conhecida desde o início do século XX. A espécie *B. coridifolia*, popularmente conhecida como “Mio-Mio”, apresentou evidências toxicológicas após descobrir intoxicações em rebanhos de ovinos e bovinos na Argentina (HOEHNE, 1978). A distribuição de *B. coridifolia* é característica nos campos do Sul do Brasil em partes do Estado de São Paulo e Uruguai, Paraguai e Argentina (HOEHNE, 1978; VARASCHIN; BARROS; JARVIS, 1998).

Segundo Habermehl et al. (1985), todas as partes da planta são tóxicas, porém a ordem decrescente de toxicidade é: flores, sementes, folhas, hastes e raízes. A morte do animal ocorre entre 4-34 horas após a ingestão de uma quantidade letal da planta (0,35g/Kg peso corporal) (HABERMEHL, 1989). A intoxicação ocorre com maior frequência em bovinos, ocasionalmente em ovinos e

mais raramente em eqüinos (VARASCHIN; BARROS; JARVIS, 1998). Em bovinos, as principais lesões são no trato gastrointestinal e consistem em degenerações, necrose e desprendimento do epitélio de revestimento do pré-estômago (HABERMEHL et al. 1985; VARASCHIN; BARROS; JARVIS, 1998).

As substâncias ativas tóxicas de *B. coridifolia* são os tricotecenos macrocíclicos. Estas substâncias tóxicas foram encontrados em culturas de vários fungos como exemplo *Fusarium* e *Myrothecium*, e por essa razão foi sugerido a hipótese que a intoxicação decorreria da associação do fungo com a planta, fenômeno este que ainda não foi esclarecido completamente (JARVIS et al., 1991).

Além de *B. coridifolia*, há toxicidade em *B. halimifolia* e *B. megapotamica*. As folhas de *B. halimifolia* foram apontadas como responsável pela morte de várias cabeças de gado na Flórida. O envenenamento de gado pela ingestão de *B. megapotamica* e *B. coridifolia* é devido ao acúmulo de tricotecenos altamente tóxicos nas plantas (MANLEY; SUNDLOF, 1982 apud JARVIS et al. 1991).

### 3.5 Aspectos químicos do gênero *Baccharis*

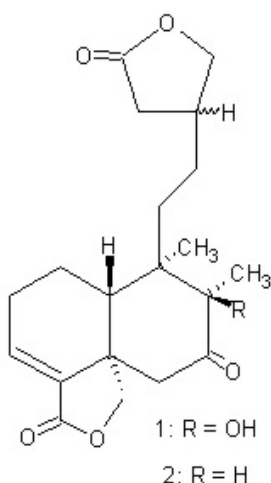
Dentre os constituintes químicos presentes nas espécies do gênero *Baccharis*, os flavonóides, diterpenos, triterpenos e óleo volátil são considerados de ocorrência predominante. Tendo em vista que os objetos de estudo deste trabalho são seis espécies de *Baccharis*, neste item são apresentados dados referentes apenas às espécies de estudo do trabalho.

Para *B. uncinella* é citado apenas um trabalho na literatura sobre a composição química do óleo volátil. Frizzo e colaboradores (2001) identificaram os seguintes compostos do óleo volátil: pineno, limoneno, globulol, nerolidol, biciclogermacreno e terpinen-4-ol.

Para as outras espécies de *Baccharis* estudadas, especialmente *B. trimera* e *B. articulata*, existem vários trabalhos abordando sua composição. Sendo assim, Oliveira (2002) relata que, dentre os constituintes presentes em *B. articulata*, os diterpenos são considerados predominantes. Dai e colaboradores (1993) citam três diterpenos do tipo ent-clerodano isolados: 7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-dehidroclerodano-15,20 diácido-dilactona; 15,16-epoxi-7, 18-dihidroxi-15-metoxi-ent-clerodano; 8-hidroxi-7-oxo-ent-clerodano-3-en-15,18-diácido-16, 19 –dilactona (Figura 7). A composição do óleo volátil de *B. articulata* foi descrita por Zunino et al. (1998) que relatam  $\alpha$ -cariofileno e trans-nerolidol como constituintes majoritários. Gianello e Giordano (1984) caracterizaram os seguintes flavonóides em *B. articulata*: gencavanina, acacetina, 7,4'-di-metil-O-apigenina, cirsimaritina e salvigenina (Figura 8).

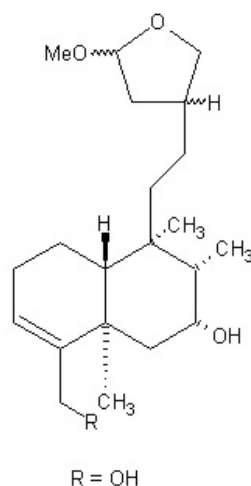
Em *B. trimera*, Gené et al. (1996) detectaram a presença de cinco saponinas, sendo que apenas uma aglicona foi obtida através de hidrólise ácida da fração bruta, tendo sido identificada como derivada do ácido equinocístico. Herz et al. (1977) revelam a presença do flavonóide eupatorina e de três diterpenos do tipo ent-clerodano (Figura 7 e Figura 8). Torres et al. (2000) também relatam a presença do flavonóide eupatorina e de um diterpeno com núcleo clerodano (Figura 7 e Figura 8). Nakasugi e Komai (1998) relatam a presença de quatro flavonóides: gencavanina, cirsimaritina, hispidulina e apigenina (Figura 8).

Para as espécies *B. microcephala*, *B. spicata* e *B. usterii* não foram encontrados relatos na literatura consultada.

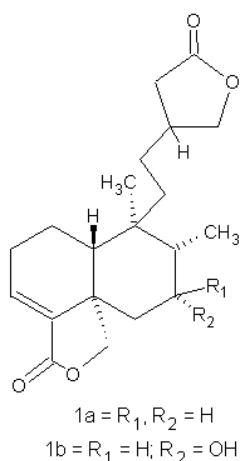


1: dilactona do ácido 8 $\beta$ ,16,19-triidroxi-7-oxo-ent-cleroda-3-en-15,18-dicarboxílico.

2: dilactona do ácido 7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-dehidroclerodano-15,20-dicarboxílico.

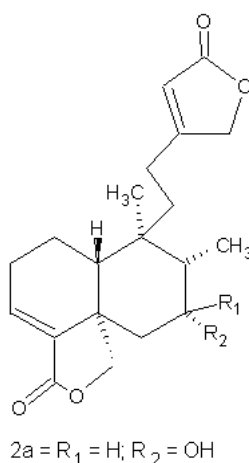


3: 15,16-epoxi-7 $\beta$ , 18-dihidroxi-15-metoxi-ent-clerodano.

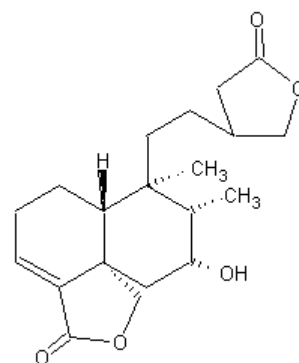


1a: dilactona do ácido 16,19-diidroxi,3,4-dihidro-ent-clerodano-15,20- dicarboxílico.

1b: dilactona do ácido 7 $\beta$ ,16,19-triidroxi-3,4-dihidro-ent-clerodano-15,20 dicarboxílico.



dilactona do ácido 7 $\beta$ -hidroxi-16,19-diidroxi-3,4,13,14-en-ent-clerodano-15,20-dicarboxílico.



dilactona do ácido 7 $\beta$ -hidroxi-16,19-diidroxi-3,4-dihidro-ent-clerodano-15,20 dicarboxílico.

Figura 7: Estruturas de diterpenos das espécies de *Baccharis articulata* e *Baccharis trimera* (HERZ et al., 1977; DAI et al., 1993; TORRES et al., 2000).

Flavonóide	R1	R2	R3	R4	R5
Acacetina	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Apigenina	OH	H	H	OH	OH
Canferol	OH	H	OH	OH	H
Centaureidina	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Cirsimaritina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H
Eupatorina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
Gencavanina	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	H
Hispidulina	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH
Jaceidina	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Jaceosidina	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Luteolina	OH	H	H	OH	OH
Nepetina	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH
Quercetina	OH	H	OH	OH	OH
Salvigenina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
5,3'- dihidroxi – 6,7,4'- trimetoxiflavona	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH

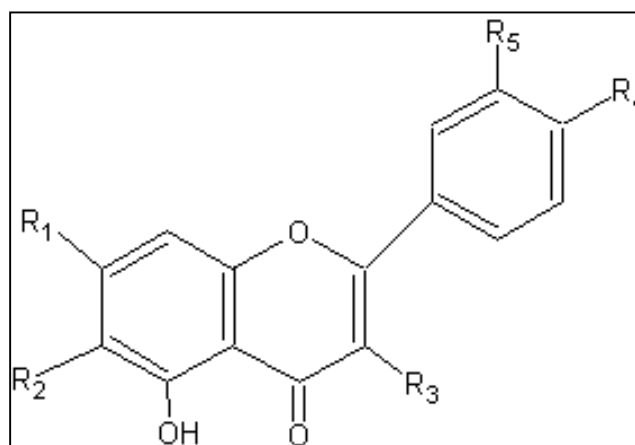


Figura 8: Flavonóides isolados de espécies do gênero *Baccharis* (SANTOS FILHO et al., 1980; GIANELLO e GIORDANO, 1984 ; SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987; NAKASUGI e KOMAI, 1998; OLIVEIRA, 2002).



### 3.6 Aspectos biológicos e farmacológicos

Devido à extensa utilização das diversas espécies do gênero *Baccharis* pela população (Tabela 1), algumas delas foram objeto de estudos biológicos e farmacológicos para a verificação de seus usos populares.

A medicina popular preconiza o uso de diversas espécies do gênero *Baccharis* para o tratamento de várias desordens gastrointestinais. Visando comprovar essa informação popular, Gamberini, Skorupa e Lapa (1991) avaliaram a atividade gastrointestinal do extrato aquoso de *B. triptera*. O extrato na dose de 1g/kg foi administrado via intraperitoneal e intraduodenal em ratos e seu efeito foi comparado ao da ranitidina na dose de 50 mg/kg. Observou-se que o pH estomacal aumentou cerca de 50% com a administração do extrato e a atividade gástrica para a administração via intraperitoneal foi de 2,8 +/- 1,9 mEq/L e para a via intraduodenal foi de 21,1 +/- 20,9 mEq/L. Para a ranitidina os valores observados foram os seguintes: para a via intraperitoneal 7,7 +/- 7,6 mEq/L e para a via intraduodenal foi de 11,1 +/- 9,9 mEq/L.

Um trabalho citado na literatura, mas com propósito diferenciado, é o relato de Argandoña e Faini (1993) que demonstraram a atividade inseticida do ácido oleanólico isolado das folhas de *B. linearis* sobre o crescimento da larva *Heliothis zea*. Comprovou-se que 1,4 mg de ácido oleanólico por grama da dieta da larva foi capaz de matá-la. Esse resultado sugere que a concentração de ácido oleanólico presente na *B. linearis* pode ser suficiente, juntamente com outras características, para atuar como um mecanismo de defesa da planta contra fitófagos.

Gené et al. (1996) investigaram as ações antiinflamatória, analgésica e os efeitos ulcerogênicos da fração butanólica obtida a partir do extrato aquoso das

partes aéreas de *B. trimera*, e verificaram que a mesma foi capaz de inibir, dose dependente, o edema induzido por carragenina.

Em 1999, Gianello et al., avaliaram a atividade de *B. calliprinos* como antiinflamatório tópico em úlceras de pele, isolaram flavonóides e avaliaram a eficácia desses frente ao edema de pata induzido por carragenina, constatando que a flavona (7,3-dimetil-éter da luteolina) foi o composto mais ativo.

A atividade antiviral *in vitro* foi descrita para *B. genistelloides* (sendo esta denominação inadequada), contra o vírus da herpes simplex tipo I (HSV-1), vírus da estomatite vesicular (VSV) e poliovírus. Os autores pesquisaram a atividade antiviral dos extratos aquoso e etanólico e verificaram que os extratos mostraram-se ativos contra os vírus HSV-1 e VSV. Para o vírus HSV-1, os extratos de *B. genistelloides* foram eficazes nas doses de 25-50 µg/mL, mas exibiram marcada citotoxicidade (ABAD et al., 1999).

Em um outro estudo, *B. trinervis* foi avaliada quanto a atividade antiviral *in vitro* contra os mesmos vírus citados acima. O extrato aquoso de *B. trinervis* exibiu potente atividade anti-HIV, inibiu a replicação do HSV-1 em 100%. O extrato aquoso exibiu atividade em concentrações de 10-400 µg/mL e nenhum efeito tóxico foi observado na concentração máxima de 400 µg/mL. (PALOMINO et al., 2002).

Torres et al. (2000), através de ensaio bioguiado, fracionaram o extrato clorofórmico das partes aéreas de *B. trimera* e verificaram que uma fração contendo uma mistura de substâncias era capaz de produzir o bloqueio da contração do músculo liso vascular induzido por íons cálcio. Os resultados preconizam que a substância isolada, um diterpeno do tipo clerodano, é o principal responsável pela atividade farmacológica produzida.

### 3.7 Cera epicuticular

A cutícula é uma membrana extracelular que recobre toda a superfície da planta (KERSTIENS, 1996; JETTER; KLINGER; SCHÄUFFER, 2002), sendo formada por três principais constituintes: cutina (polímeros de ácidos graxos di- e trihidroxilados), polissacarídeos e ceras (o qual inclui todas as moléculas que podem ser extraídas da matriz cutina-polissacarídeo com solvente orgânico). As ceras estão localizadas no interior da matriz cuticular (ceras intracuticulares) e na superfície das plantas (ceras epicuticulares) (KERSTIENS, 1996) (Figura 9 e Figura 10).

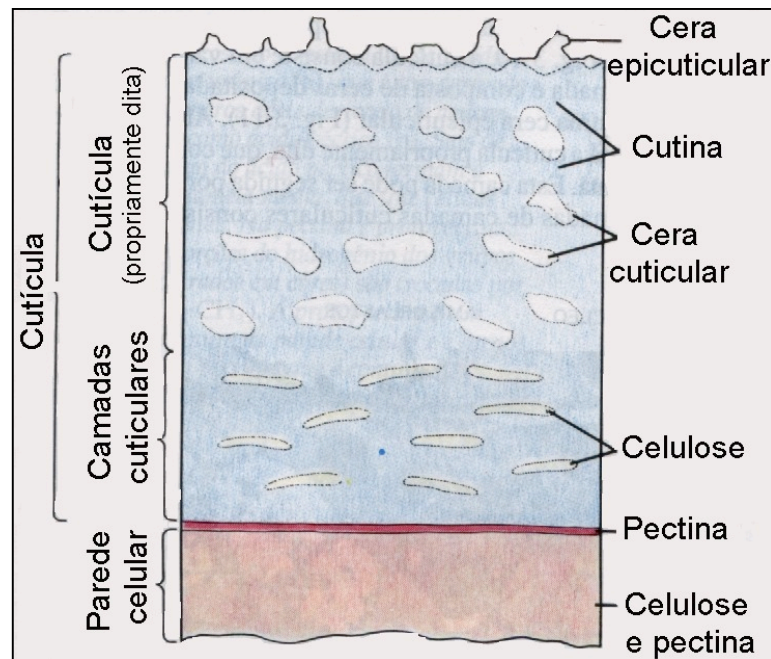


Figura 9: Esquema representativo da cutícula dos vegetais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996)



Figura 10: Foto da membrana celular caracterizando a cera epicuticular no vegetal (ALQUINI et al., 2003)

Diversas funções biológicas tem sido atribuídas à cera epicuticular. A cera epicuticular fornece uma barreira físico-química, que impede a perda de água pela planta, protege a planta da invasão por fungos e outros organismos nocivos (KERSTIENS, 1996; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000; JETTER; KLINGER ; SCHÄUFFER, 2002), protege os tecidos de danos mecânicos, reflete e atenua a radiação ultravioleta, atua como um compartimento de acúmulo para compostos lipofílicos (KERSTIENS, 1996), mantém a superfície da planta seca e previne a germinação de esporos patogênicos (JETTER; KLINGER; SCHÄUFFER, 2002).

A composição da cera epicuticular pode ser estudada com diferentes objetivos: finalidades quimiotaxonômicas, avaliação da relação planta-inseto e avaliação da permeabilidade cuticular (STAMMITTI; DERRIDJI; GARREC, 1996).

Os hidrocarbonetos da cera epicuticular das folhas, em particular os n-alcanos, tem sido utilizados como marcadores taxonômicos, principalmente, para os níveis hierárquicos de gênero e espécie (SKORUPA; SALATINO; SALATINO, 1998). A cera é constituída de hidrocarbonetos, aldeídos, ésteres, álcoois graxos, cetonas e

ácidos graxos (ATHAYDE, COELHO; SCHENKEL, 2000). Segundo Jetter, Klinger e Schäffer (2002), há uma predominância de compostos alifáticos de cadeia longa, e eles relatam ainda, que a presença de compostos fenólicos na superfície da planta tem especial interesse, pois estes compostos servem como protetores devido à sua capacidade de absorção de luz ultravioleta. Também há relatos da presença de terpenos na cera epicuticular, principalmente triterpenos pentacíclicos do tipo  $\Delta^5$ - e  $\Delta^3$ -amirina, sendo os ácidos ursólico e oleanólico os mais comuns (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000).

A seguir, estão descritos na Tabela 2 alguns exemplos de constituintes da cera epicuticular em algumas espécies vegetais.

Tabela 2: Constituintes da cera epicuticular de algumas espécies vegetais.

Especificação	Constituintes	Referência
<i>Arrabidaea brachypoda</i> (Bignoniaceae)	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona, cirsiol, cirsimarina e hispidulina	ALCERITO et al. (2002)
<i>B. heterophylla</i> (Asteraceae)	Ácido oleanólico e maniladiol	GINER et al. (1986)
<i>B. linearis</i> (Asteraceae)	Éster lachnofilum, espatulenol, werniacromona, dihidrobenzofurano acetilado, cromona, ácido oleanólico, ácido maslinico, 3-O-metilcanferol, 3-O-metilquercetina, 3,3'-O-dimetilquercetina, ácidos diterpenicos.	FAINI; LABBÉ; COLL (1999)
<i>B. sarothroides</i> (Compositae)	Ácido oleanólico, ácido hautriwaico e 2-hidroxihautriwaico.	GINER et al. (1986)
<i>B. vaccinoides</i> (Compositae)	Ácido oleanólico, maniladiol e ácido hautriwaico.	GINER et al. (1986)
<i>Bystropogon canariensis</i> (Lamiaceae)	Ácido oleanólico e ácido ursólico	WOLLENWEBER et al. (1999)

Especificação	Constituintes	Referência
<i>Callistemon coccineus</i> (Myrtaceae)	5,4'-dihidroxi-8-C-metil-7-metoxi flavanona	WOLLENWEBER et al. (2000)
<i>Copernicia cerifera</i>	Quitinase e $\alpha$ -1,3-glucanase (proteínas)	CRUZ et al. (2002)
<i>Cussonia spicata</i> (Araliaceae)	Lupeol, $\alpha$ - e $\beta$ - amirina, betulina	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Cyphostemma juttae</i> (Vitaceae)	Mistura de acetato de $\alpha$ - e $\beta$ - amirina, acetato de germanicol	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Dendranthema nipponica</i> (Asteraceae)	$\alpha$ - e $\beta$ - amirina, lupeona	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Hoya australis</i> (Asclepiadaceae)	Triterpenos pentacíclicos: $\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina, e lupeol.	BAAS et al. (1992)
<i>Ilex paraguariensis</i> (Aquifoliaceae)	Cafeína e teobromina	ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, (2000)
<i>Metrossideros robusta</i> (Myrtaceae)	5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-6-C-metilflavona.	WOLLENWEBER et al. (2000)
<i>Papaver spp.</i> (Papaveraceae)	Alcanodióis: docosano-1,3-diol, hexacosano-1,7-diol, octacosano-1,9-diol, nonacosano-1,10-diol e triacontano-1,11-diol.	JETTER et al. (1996)
<i>Phoradendron juniperinum</i> (Loranthaceae)	Ácido oleanólico	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Pilocarpus spp.</i> (Rutaceae)	Hidrocarbonetos (principalmente n-alcanos): C <sub>29</sub> , C <sub>30</sub> , C <sub>31</sub> e compostos aromáticos.	SKORUPA; SALATINO; SALATINO, (1998)
<i>Prunus laurocerasus</i> (Rosaceae)	Alcanos, alcoois primários, ácidos graxos livres.	STAMMITTI; DERRIDJI; GARREC, (1996)
<i>Sedum morganianum</i>	$\alpha$ - e $\beta$ - amirina e acetato de $\beta$ - amirina	WOLLENWEBER et al. (1999)

Especificação	Constituintes	Referência
(Crassulaceae)		
<i>Sinofranchetia sinensis</i> (Lardizabalaceae)	Acetato de $\beta$ - amirina e de germanicol	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Taxus baccata</i> (Gymnospermae)	Ésteres de cadeia longa: 3-(4'-hidroxifenil)-propil ésteres de ácidos graxos C <sub>20</sub> -C <sub>36</sub> ; 4-(4'-hidroxifenil)-2 butil ésteres de ácidos graxos C <sub>18</sub> -C <sub>28</sub> ; 3-(3', 4'-dihidroxifenil)-propil ésteres de ácidos graxos C <sub>20</sub> -C <sub>32</sub> e 4-(3', 4' dihidroxifenil)-2-butyl ésteres de ácidos graxos C <sub>18</sub> -C <sub>28</sub> .	JETTER; KLINGER; SCHÄFFER, (2002)
<i>Wyethia mollins</i> (Compositae)	n-alcanos (C <sub>15</sub> , C <sub>16</sub> , C <sub>17</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>20</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>23</sub> , C <sub>24</sub> , C <sub>25</sub> , C <sub>27</sub> , C <sub>29</sub> ), isoflavonas (5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-isoflavona e 5, 3', 4'-trihidroxi-7-metoxi-isoflavona)	WADDELL et al. (1982)
<i>Xerosicyos danguyi</i> (Curcubitaceae)	Friedelina, acetato de lupeol e germanicon (olean-18-en-3-ona)	WOLLENWEBER et al. (1999)
<i>Zenobia pulverulenta</i> (Ericaceae)	Ácidos oleanólico e ursólico	WOLLENWEBER et al. (1999)

Na literatura, há relatos de atividade biológica com o extrato da cera epicuticular. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Alcerito et al., (2002) que testaram a atividade do extrato da cera das folhas de *Arrabidaea brachypoda*. O extrato clorofórmico da cera foi submetido a uma cromatografia em camada delgada e ao bioensaio com suspensão de esporos de *Cladosporium sphaerospermum*, e apresentou três regiões fungitóxicas. As substâncias isoladas, cirsimaritina, cirsilol e 3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxi-flavona, inibiram o crescimento de *Cladosporium sphaerospermum* com 1µg. Há descrições de que a cera exerce uma barreira físico-química contra o ataque por microorganismos e a inibição do crescimento do fungo pelos flavonóides isolados da cera reforça o papel ecológico desses compostos.

Faini, Labbé e Coll (1999) relatam que, altas concentrações do ácido oleanólico, nas folhas de *B. linearis*, poderia constituir uma barreira física preventiva ao ataque de microorganismos.

Um trabalho com enfoque diferente é apresentado por Cruz et al. (2002), que isolaram proteínas da cera epicuticular de *Copernicia cerifera* e relatam a atividade antifúngica dessas proteínas. Os autores sugerem que as enzimas quitinase e glucanase inibem o crescimento de fungos, contribuindo para o mecanismo de defesa das plantas contra fungos.

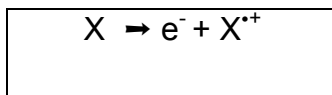
### **3.8 Atividade antioxidante**

O oxigênio é o elemento mais abundante na crosta terrestre e evidências geológicas sugerem que isso foi devido a evolução de fotossíntese por algas. Exceto para alguns organismos unicelulares anaeróbios e aeróbios tolerantes, todos os animais, plantas e bactérias requerem oxigênio (O<sub>2</sub>) para produção eficiente de energia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Um dos paradoxos da vida é que o oxigênio não só é essencial para o metabolismo de energia e respiração, mas também implica em muitas doenças e condições degenerativas (MARX, 1987). Diversos distúrbios patológicos, como inflamação, artrite reumatóide, aterosclerose, câncer, envelhecimento, mutações, disfunção renal, Mal de Parkinson, Alzheimer, lesão pós-isquemia e repersufão do cérebro, fígado, pulmões, coração, pele, intestino, rins, pâncreas e músculos, podem estar relacionados com as diversas formas reduzidas de oxigênio que são altamente reativas e danosas aos organismos. Estas espécies são denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres de oxigênio (KEHRER, 1993; GROOT; RAUEN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

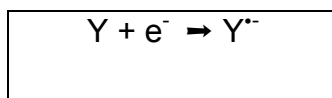


Os radicais livres de oxigênio são definidos como espécies reativas que contém um ou mais elétrons não pareados no seu orbital (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Cada orbital pode ter no máximo dois elétrons, os quais ficam normalmente pareados na sua órbita externa. Os radicais podem ser formados pela perda (Equação 1) de um elétron de uma molécula não radicalar,



Equação 1

ou pelo ganho (Equação 2) de um elétron de uma molécula não radicalar (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



Equação 2

Ainda, as espécies reativas de oxigênio, relacionadas na Tabela 3, são formadas através da redução parcial do oxigênio até a água, que ocorre através de sucessivas reações univalentes, como mostra a Figura 11. A transferência de um elétron para o  $O_2$  produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Qualquer reação posterior requer a quebra das ligações entre os átomos de  $O_2$  para formar o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), que pode ser catalisada por metais de transição (Reação de Fenton) ou pela combinação de  $O_2^{\cdot-}$  com o  $H_2O_2$  (Reação de Haber–Weiss) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

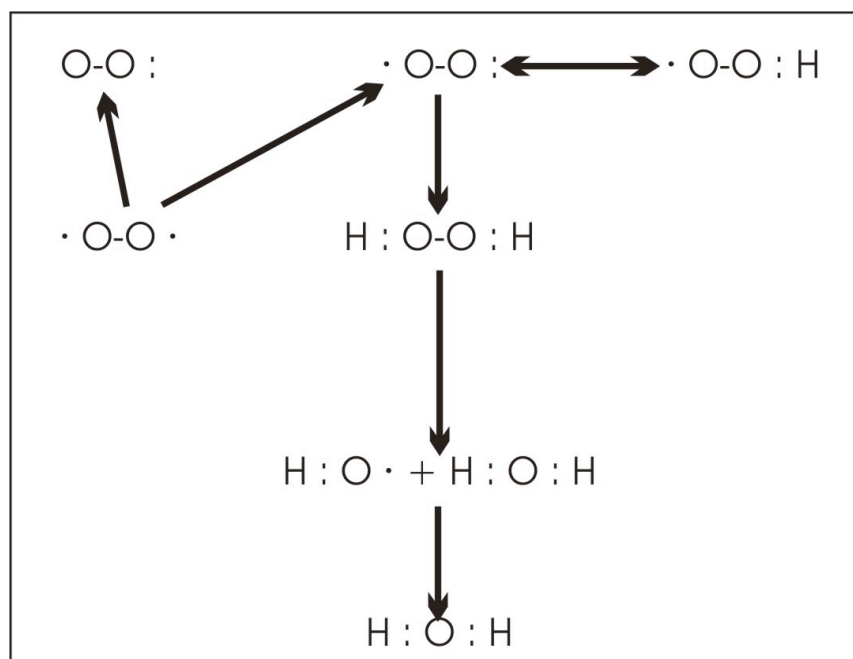


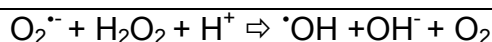
Figura 11: Esquema demonstrando estado de ativação do oxigênio, onde  $\cdot \text{O} - \text{O} \cdot$  representa o oxigênio,  $\cdot \text{O} - \text{O} :$  radical superóxido,  $\text{O} - \text{O} : \text{H}$  radical perhidroxila,  $\text{H} : \text{O} - \text{O} : \text{H}$  peróxido de hidrogênio,  $\text{H} : \text{O} \cdot$  radical hidroxila e  $\text{H} : \text{O} : \text{H}$  água (MCKERSIE, 1996).

Tabela 3: Espécies reativas de oxigênio (YOSHIDA, 1996; GROOT; RAUEN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Radicais	Não radicais
Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ )	Ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ )
Peroxila ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ )	Ozônio ( $\text{O}_3$ )
Alcoxila ( $\text{RO}^{\cdot}$ )	Oxigênio singleto ( $\text{O}_2^{\cdot}$ )
Hidroperoxila ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $\text{NO}_3^{\cdot}$ )

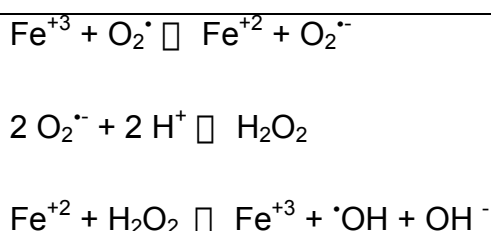
O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre pois não apresenta elétrons desemparelhados em seu orbital, mas adquire importância na lesão celular pela sua capacidade de reagir com o ferro, gerando radical hidroxila.

Na presença de peróxido de hidrogênio o superóxido pode dar origem “in vivo” ao radical hidroxila através de uma reação descrita por Haber-Weiss (Equação 3) (KEHRER, 1993; YOSHIDA, 1996).



Equação 3

A reação se propaga de forma muito lenta e isoladamente tem pouco significado biológico. Na presença de certos metais de transição (ferro, cobre), o radical hidroxila pode ser formado muito mais rapidamente, como descreve a reação de Fenton (Equação 4) (KEHRER, 1993; YOSHIDA, 1996; GROOT; RAUEN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIOCHEV; FRIDOVICH, 2002; DUNFORD, 2002):



Equação 4

Há outras formas de radicais envolvidos no dano celular, como por exemplo o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que é formado pela reação entre  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{NO}^{\cdot}$ . O peroxinitrito pode agir diretamente oxidando biomoléculas em grupamentos tióis ou em grupos fenólicos (GROOT; RAUEN, 1998).

Uma vez que as espécies reativas de oxigênio interagem com os tecidos muitas mudanças podem ocorrer, levando o organismo a um estado de estresse oxidativo. Esse estado gera um distúrbio entre o balanço dos sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, submetendo os organismos a efeitos deletérios (KEHRER, 1993).

Os organismos aeróbios foram dotados ao longo da evolução por sistemas de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático, com a finalidade de minimizar os efeitos danosos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os principais antioxidantes enzimáticos consistem nas enzimas superóxido dismutase que neutraliza o superóxido, a catalase que neutraliza o peróxido de hidrogênio e a glutathione peroxidase que neutraliza os radicais hidroperóxidos de ácidos graxos formado pela reação de radicais livres com ácidos graxos (YOSHIDA, 1996; GROOT; RAUEN, 1998). Antioxidantes exógenos, não enzimáticos, também podem neutralizar os radicais livres, e estes incluem: vitamina E, vitamina A, vitamina C e flavonóides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RIETJENS et al., 2002).

As espécies reativas de oxigênio são extremamente reativas, pois estão sempre ávidas por capturar elétrons de qualquer outro átomo ou molécula para estabilizar sua configuração. Com isso podem atacar a matriz extracelular, degradando o ácido hialurônico e o colágeno, podem também danificar a membrana celular e a membrana das organelas, através da peroxidação da estrutura fosfolipídica que é peculiar às membranas (YOSHIDA, 1996).

A peroxidação lipídica serve como um sinal do estresse oxidativo celular e tem sido reconhecida por contribuir a danos oxidativos no organismo que culmina em vários processos patológicos, como inflamação e doenças crônicas como aterosclerose e câncer (SEVANIAN; URSINI, 2000).

A peroxidação lipídica é definida como uma deteriorização dos lipídeos poliinsaturados. As membranas celulares são constituídas por ácidos graxos poliinsaturados e possuem uma estrutura de bicamada lipídica onde externamente está a parte hidrofílica e internamente a parte hidrofóbica como mostra a Figura 12 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

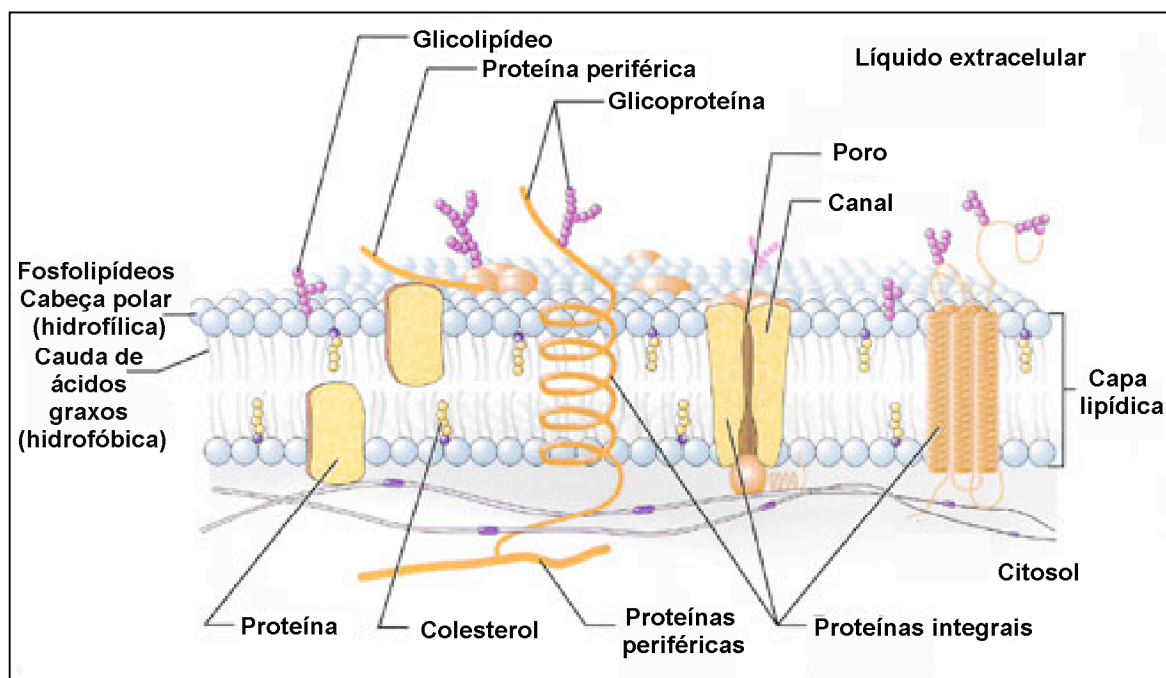


Figura 12: Figura representativa da bicamada lipídica (PEÑA et al., 2001).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pelas espécies reativas de oxigênio, principalmente radical hidroxila, e inclui 3 principais eventos: iniciação, propagação e término (Figura 13) (WAGNER; BUETTNER; BURNS, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

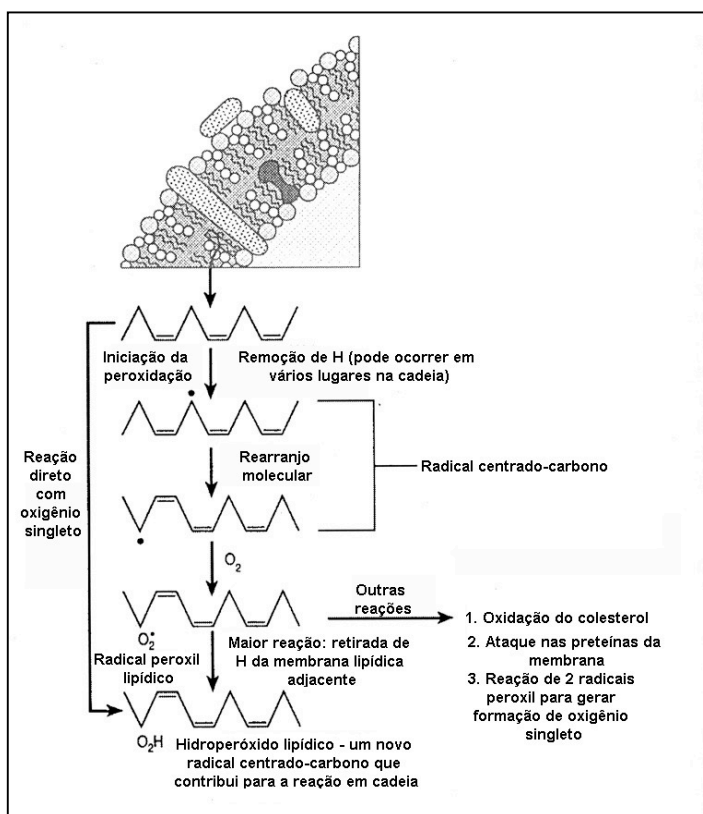


Figura 13: Esquema representativo das reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica envolvendo o radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A iniciação (Figura 13) ocorre quando uma espécie química altamente oxidante, tal como o radical hidroxila, retira um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-CH_2$ ) dos ácidos graxos poliinsaturados, deixando o grupo metileno com um elétron não pareado no carbono ( $-CH^\bullet$ ). O rearranjo das duplas ligações resulta na formação de um dieno conjugado com configuração molecular mais estável. Os dienos conjugados, em condições aeróbicas, reagem com oxigênio molecular, formando radical peróxido ( $LOO^\bullet$ ), marcando assim o início das reações de propagação. O radical peróxido é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, propagando a reação em cadeia da lipoperoxidação. O radical peróxido combina-se com o átomo de hidrogênio retirado pelo radical peróxido do ácido graxo adjacente e ocorre a formação de lipoperóxidos e este dá origem aos

peróxidos e endoperóxidos cíclicos (WAGNER; BUETTNER; BURNS, 1994; YOSHIDA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SEVANIAN; URSINI, 2000).

A peroxidação lipídica também pode ser iniciada através do radical ascorbila. O ácido ascórbico (Figura 14) em pH fisiológico é capaz de complexar-se com íons metálico (por exemplo o ferro) e gerar um complexo  $\text{Fe}^{+3}$ -ascorbato, no qual, um elétron do ascorbato reduz o íon metálico ferro formando um complexo radical ascorbil- $\text{Fe}^{+2}$ , que então, é capaz de retirar um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados e propagar a reação de peroxidação lipídica, assim como descrito acima para o radical hidroxila (CASALINO; SBLANO; LANDRISCINA, 1996).

A menos que seja interrompida pelos antioxidantes, esta sequência de reações resulta em destruição da membrana e morte celular (YOSHIDA, 1996). Entre os produtos de degradação estão os aldeídos, tal como dialdeído malônico, e hidrocarbonos. O dialdeído malônico é dosado através do teste do ácido tiobarbitúrico, e é amplamente usado como indicador da ocorrência de lipoperoxidação (YOSHIDA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Cabe aqui ressaltar que os ácidos graxos são instáveis na presença de ferro ou de outro metal, devido a ocorrência da reação de Fenton (descrita acima) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

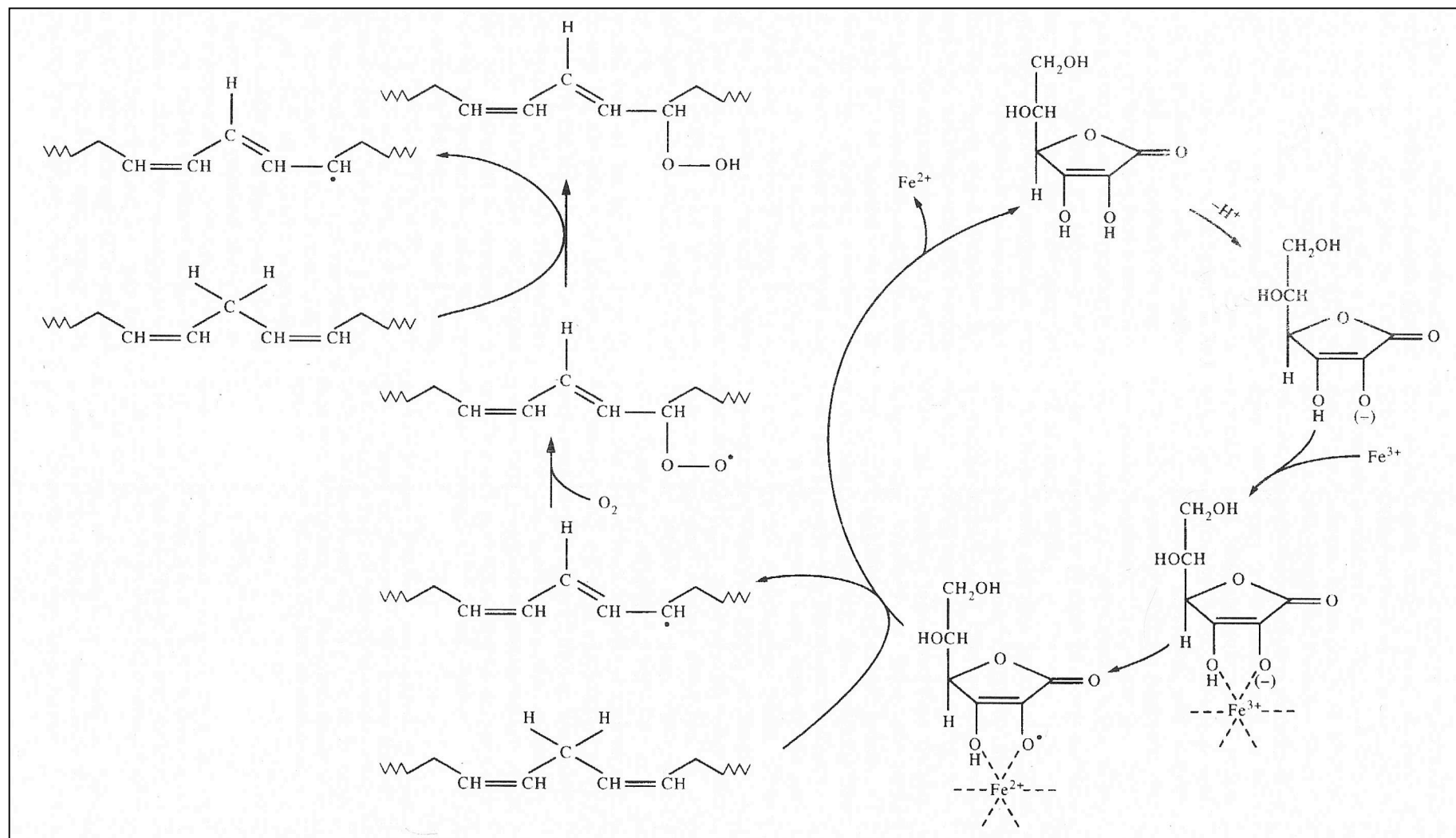


Figura 14: Esquema representativo do mecanismo do início e da propagação da peroxidação lipídica envolvendo o radical ascorbila (Fonte: CASALINO, SBLANO, LANDRISCINA; 1996).

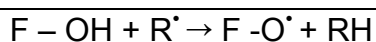


O instrumento de trabalho desta dissertação, espécies de *Baccharis*, na literatura são descritas como sendo espécies ricas em flavonóides e terpenos. Essas substâncias são de fundamental importância na avaliação da atividade antioxidante dessas plantas.

Ng, Liu e Wang (2000) demonstraram que flavonóides como baicalina, rutina e luteolina-7-glucuronide-6'-metil éster e o terpeno tanshinona I são capazes de inibir a peroxidação lipídica. Os autores ainda relatam que a atividade antioxidante do tanshinona I é devido ao anel furano presente em sua estrutura.

Já Hung e Yen (2001) relatam sobre a atividade antioxidante dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico e oleanólico, e afirmam que estes compostos são potentes inibidores da peroxidação lipídica.

O interesse na pesquisa com flavonóides tem aumentado nos últimos anos, devido a sua ampla atividade farmacológica. Os efeitos farmacológicos dos flavonóides estão relacionados com a inibição de determinadas enzimas (atividade antiinflamatória) e atividade antioxidante (ACKER, et al. 1996). A configuração espacial e o número de hidroxilas substituídas na molécula do flavonóide é um fator determinante para sua atividade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A capacidade de seqüestrar espécies reativas de oxigênio é atribuída à alta reatividade das hidroxilas na estrutura do flavonóide, como mostra a Equação 5 (ACKER et al, 1996; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002):



Equação 5

A presença das hidroxilas no anel B é de maior significância na capacidade do flavonóide em sequestrar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os

grupos hidroxilas do anel B doam hidrogênio para os radicais hidroxila, peroxila e peroxinitrito, estabilizando-os e gerando um radical flavonóide estável (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

---

## 4 Materiais e Métodos

## 4.1 Equipamentos usados

### 4.1.1 *Equipamentos para análise espectroscópica*

Espectrofotômetro de ultravioleta, Perkin Elmer UV- vis<sup>□</sup>; Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear foi realizada em equipamento Bruker 500 MHz através da colaboração do Prof. Dominique Guillaume e da doutoranda Viviane Silva Pires, na Universidade de Picardie Jules Verne (UPJV), Amiens, França; Espectroscopia de Infravermelho foi realizado em equipamento FTIR Shimatzu<sup>□</sup>.

### 4.1.2 *Equipamentos para análise de atividade antioxidante*

Agitador magnético, Fisatom<sup>□</sup>; Balança analítica, Sartorius<sup>□</sup>; Banho maria, Quimis<sup>□</sup>; Centrífuga, Fanem<sup>□</sup>; Centrífuga refrigerada, Hitachi<sup>□</sup>; Espectofotômetro, Hitachi<sup>□</sup>; Freezer - 80°C, Harris<sup>□</sup>; Homogenizador, Glas-Col<sup>□</sup>; PH metro, Schott<sup>□</sup>; Microcentrífuga, Eppendorf<sup>□</sup>;

### 4.1.3 *Procedimentos gerais*

Os solventes e reagentes empregados neste trabalho para a análise fitoquímica foram de procedências variadas: Nuclear<sup>□</sup>, Merck<sup>□</sup>, Reagen<sup>□</sup> e Synt<sup>□</sup>. A água utilizada nos experimentos foi destilada no laboratório.

As cromatografias em colunas foram realizadas em gel de sílica 60 de procedência Carlos Erba, com partículas de tamanho 0,05 – 0,2 mm. As cromatografias em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de alumínio F<sub>254</sub> de procedência Merck<sup>□</sup>.

A detecção dos flavonóides e terpenos foi realizada mediante observação sob lâmpada de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 360 nm e visualizados com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico após aquecimento a

100°C. Alguns cromatogramas foram revelados com reagente natural A, vanilina sulfúrica e vanilina fosfórica e posterior aquecimento a 100°C. Os extratos e as frações obtidas das colunas cromatográficas foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura inferior a 45°C.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram empregados métodos espectroscópicos, como: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia no infravermelho e no ultravioleta.

Nos experimentos para análise de atividade antioxidante foram utilizados os reagentes das seguintes marcas: Merck<sup>□</sup>, Sigma<sup>□</sup>, Synth<sup>□</sup> e Ecibra<sup>□</sup>. No modelo experimental de microssomas foram utilizados ratos machos Wistar adultos provenientes do laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima R.M. da Silva, mantidos à temperatura ambiente de 22-25°C, com água e ração, de acordo com as recomendações éticas.

## 4.2 Material vegetal

As partes aéreas de *B. uncinella* A.P de Candolle foram coletadas nos campos da região de Urubici, Santa Catarina, no final do mês de março de 2002. O material vegetal foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Nelson Ivo Matzembacher. O material testemunho está depositado no herbário ICN do departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, catalogado sob o número 129479.

As partes aéreas de *B. trimera* (Less.) A.P. DC., *B. articulata* (Lam.) Pers., *B. microcephala* (Less.) A.P. de Candolle, *B. spicata* (Lam.) Baillon e *B. usterii* Heering foram coletadas na Fazenda São Maximiliano no município de Guaíba no Rio Grande do Sul, no final de janeiro de 2003. Para essas espécies o material

testemunho também foi depositado no herbário ICN e identificado pelo botânico Prof. Dr. Nelson Ivo Matzembacher e estão catalogadas sob o número: 129475, 129476, 129477, 129478 respectivamente.

Os materiais vegetais foram secos em estufa de ar circulante com temperatura inferior a 40°C, ao abrigo da luz e calor. Com esses materiais foram realizadas as preparações dos extratos para análise fitoquímica e análise de atividade antioxidante.

### **4.3 Preparação dos extratos**

Os extratos, tanto para análise fitoquímica quanto para a análise de atividade antioxidante, foram preparados através da imersão das partes aéreas das plantas em acetona. O que diferiu na preparação dos extratos foi o tempo de imersão das partes aéreas.

#### **4.3.1 Análise fitoquímica**

O processo extrativo foi realizado com cerca de 340 g das partes aéreas de *B. uncinella*. A extração foi conduzida em cuba de vidro onde adicionou-se 1 L de acetona e acrescentou 55 g das partes aéreas do vegetal deixando-o imerso por 3 minutos. Após os três minutos, o material vegetal foi retirado e o extrato acetônico foi filtrado e armazenado. Após evaporação da acetona em evaporador rotatório com pressão reduzida, o rendimento do extrato foi avaliado com base na quantidade das partes aéreas do vegetal.

#### **4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante**

A análise da atividade antioxidante foi realizada com as seguintes espécies de *Baccharis*: *B. trimera*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. spicata*, *B. usterii* e *B. uncinella*. Tendo em vista que a extração por três minutos do material vegetal em

acetona apresentava coloração esverdeada, denotando assim extração de clorofila além do material de revestimento epicuticular, o tempo de extração foi limitado a um minuto para os extratos. A extração foi conduzida em cuba de vidro onde adicionou-se 250 mL de acetona e acrescentou 13 g das partes aéreas do vegetal.

Após evaporação dos extratos em evaporador rotatório com pressão reduzida, os rendimentos foram avaliados.

#### **4.4 Fracionamento do extrato de *B. uncinella* para análise fitoquímica**

O extrato acetônico de *B. uncinella* A. P de Candolle foi ressuspenso em metanol : água (90:10 v/v) onde houve a formação de um precipitado de coloração pérola. O precipitado foi separado através de uma filtração em papel filtro e ao filtrado foi adicionado mais água até formação de duas fases. Separou-se a fase aquosa e realizou-se a partição com solventes de polaridade crescente, n-hexano (5x50mL), diclorometano (3x100mL) e acetato de etila (3x100mL), conforme mostra a Figura 15.

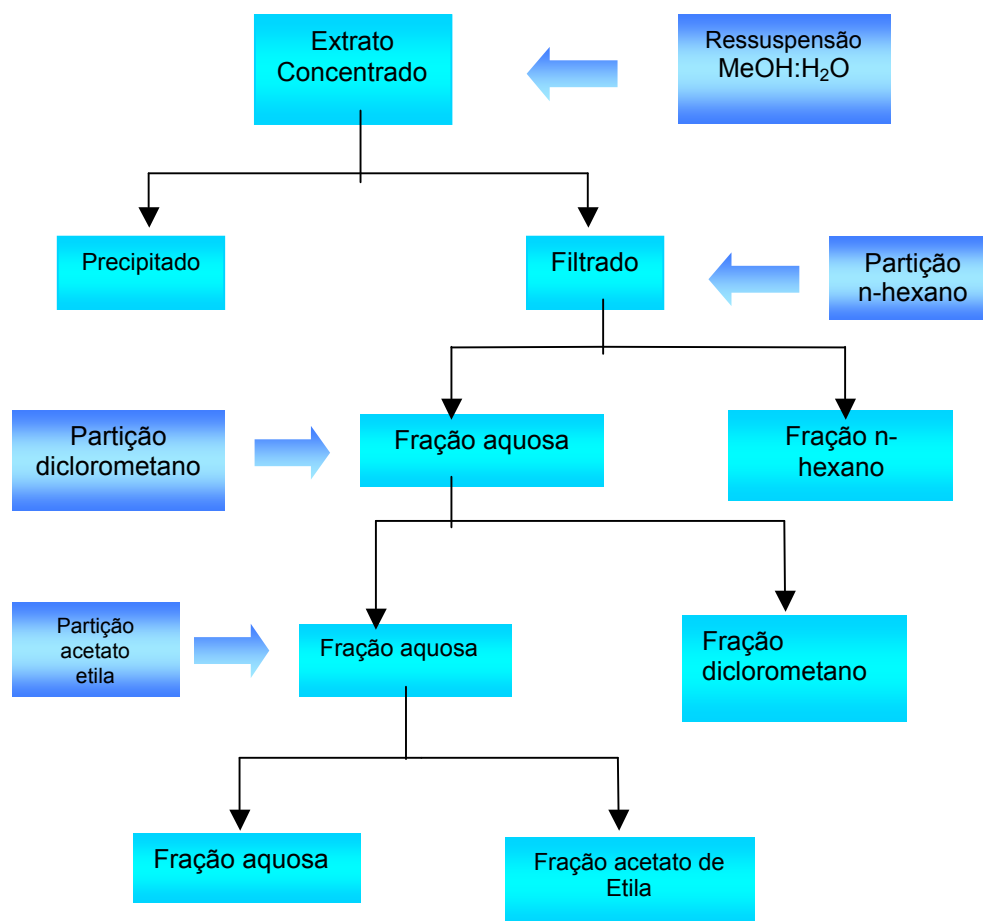


Figura 15: Esquema de fracionamento do extrato acetônico de *Baccharis uncinella*.

#### 4.5 Análise cromatográfica

As frações aquosa, n-hexano, diclorometano, acetato de etila, precipitado e o extrato acetônico, foram analisados através de cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel diclorometano : metanol (96:4 v/v), e a revelação foi realizada com reagente natural A e vanilina fosfórica.

As substâncias isoladas também foram analisadas cromatograficamente.

#### 4.6 Isolamento da substância BU1 a partir do precipitado



O precipitado formado no momento da ressuspensão do extrato acetônico, foi acetilado na quantidade de 500 mg em presença de 1 mL de piridina e 3 mL de anidrido acético, com a finalidade de obter uma amostra mais pura.

A solução permaneceu em repouso por 12 horas, onde posteriormente foi adicionado água destilada gelada, havendo a formação de precipitado. O precipitado formado foi exaustivamente lavado com água destilada gelada e em seguida foi filtrado em funil de vidro sinterizado. O produto rendeu 350 mg, foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica, sendo empregado como eluente o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) onde foram obtidas quatro frações, conforme descrito na Figura 16. A fração PA2 originou a substância codificada como a BU1A.

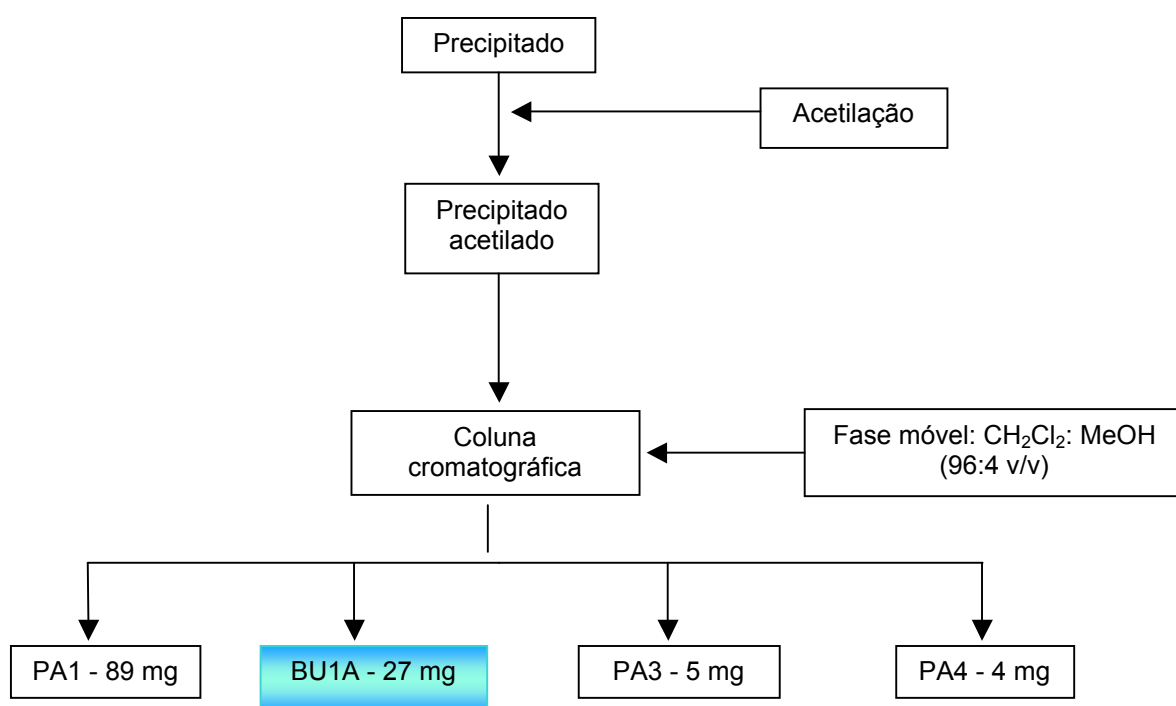


Figura 16: Isolamento da substância BU1.

#### **4.7 Isolamento da substância BU2 a partir da fração acetato de etila.**

A fração acetato de etila, cuja quantidade foi de 3,2 g, foi cromatografada em coluna de gel de sílica empregando como fase móvel o diclorometano, originando quatro frações, sendo nomeadas: FA, FB, FC e FD.

A fração FD foi cromatografada em coluna de gel de sílica tendo como fase móvel éter de petróleo (EP) : acetato de etila (Ac Et) com proporções que variaram de 1:1(v/v) e 1:2 (v/v). Desta coluna obtiveram-se as seguintes frações: CM1, CM2, CM3, CM4 e CM5. Partindo da fração CM2 (296 mg), o qual apresentava a substância de interesse, fez-se novamente uma coluna em gel de sílica cujo o eluente foi diclorometano : acetona (20:4 v/v). Nesta obtiveram-se seis frações FP1, FP2, FP3, FP4, FP5 e FP6. A fração FP6 (132 mg) apresentava-se quase pura sendo necessário a realização de uma nova coluna. A fração foi purificada em gel de sílica usando como eluente diclorometano : acetona (28:2 v/v). As frações obtidas desta coluna foram: C5a, C5b, C5c, C5d, C5e e C5f. As frações C5d e C5e eram puras e apresentavam a mesma substância, sendo assim foram reunidas e a substância foi designada BU2, conforme mostra a Figura 17.

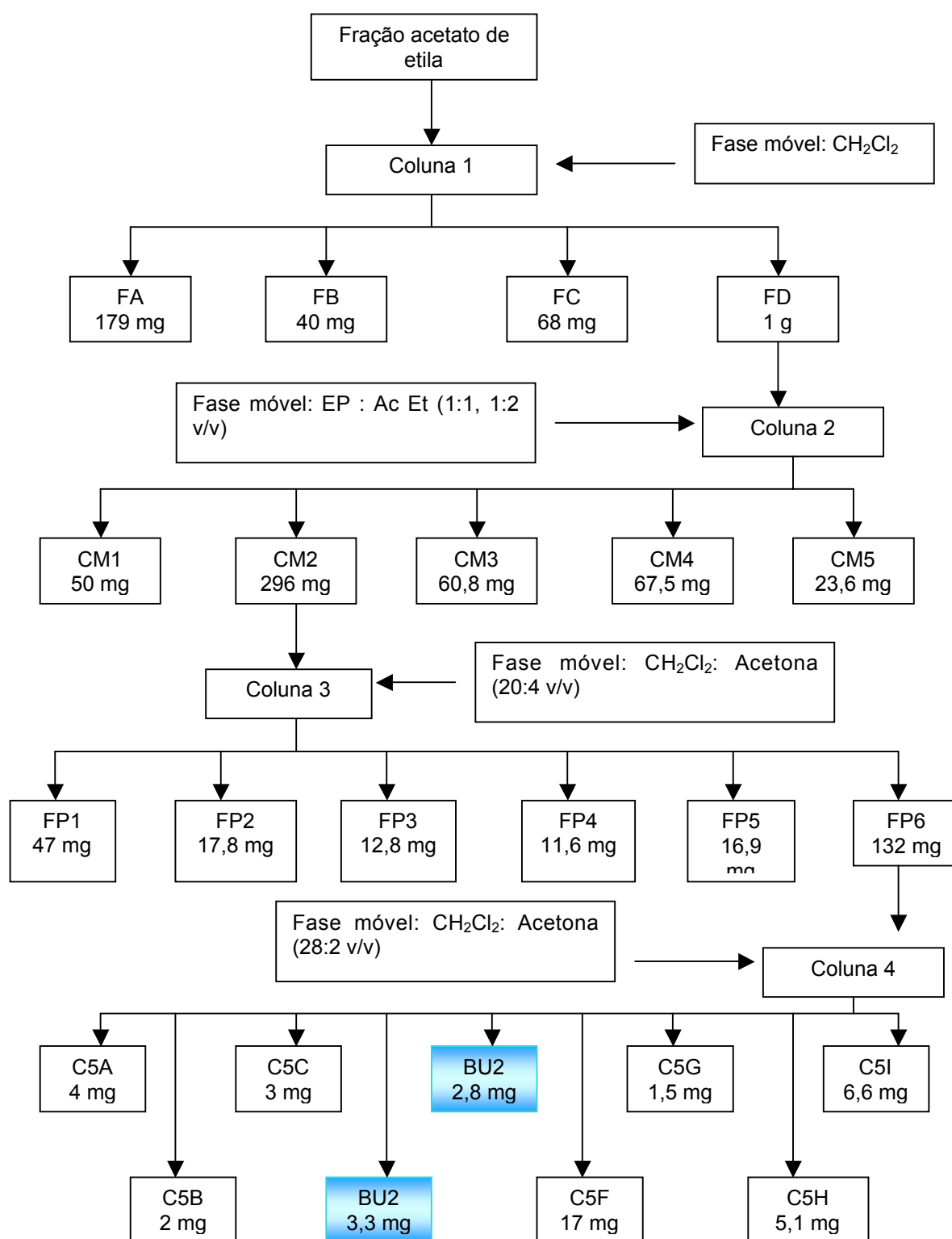


Figura 17: Isolamento da substância BU2 a partir da fração acetato de etila.

#### 4.8 Isolamento das substâncias BU3, BU4 e BU5 partindo da fração diclorometano

##### 4.8.1 Isolamento da BU3

A partir de 10g da fração diclorometano (Figura 15) foi realizado uma coluna em gel de sílica utilizando como fase móvel diclorometano. Desta coluna foram obtidas 23 frações, sendo que em uma delas a C6O foi obtida uma substância pura, nomeada como BU3. Observe o esquema a seguir.

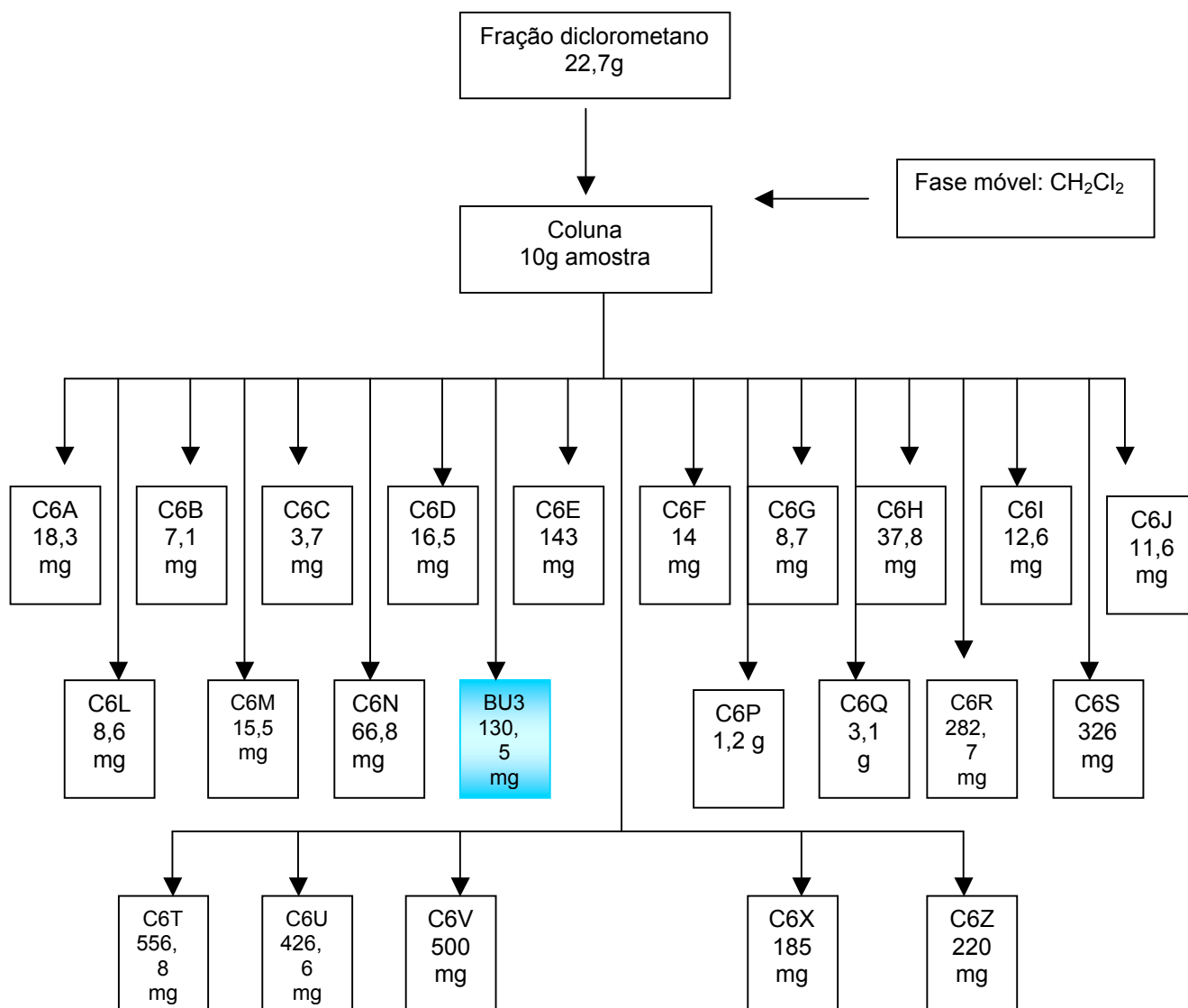


Figura 18: Isolamento da substância BU3.

#### 4.8.2 Isolamento da BU4

De acordo com a Figura 18, a fração diclorometano produziu algumas frações, dentre elas a fração C6Q que foi cromatografada em coluna de gel de sílica tendo usado como eluente diclorometano : metanol (95:5 v/v). Desta coluna foram obtidas 13 frações. A fração Q12 apresentava-se enriquecida de uma substância de interesse do trabalho, a BU4. Foi realizada uma purificação da fração Q12 em coluna de gel de sílica usando como fase móvel diclorometano : metanol (98:2 v/v). A partir dessa purificação resultou a obtenção de uma substância pura, nomeada como BU4.

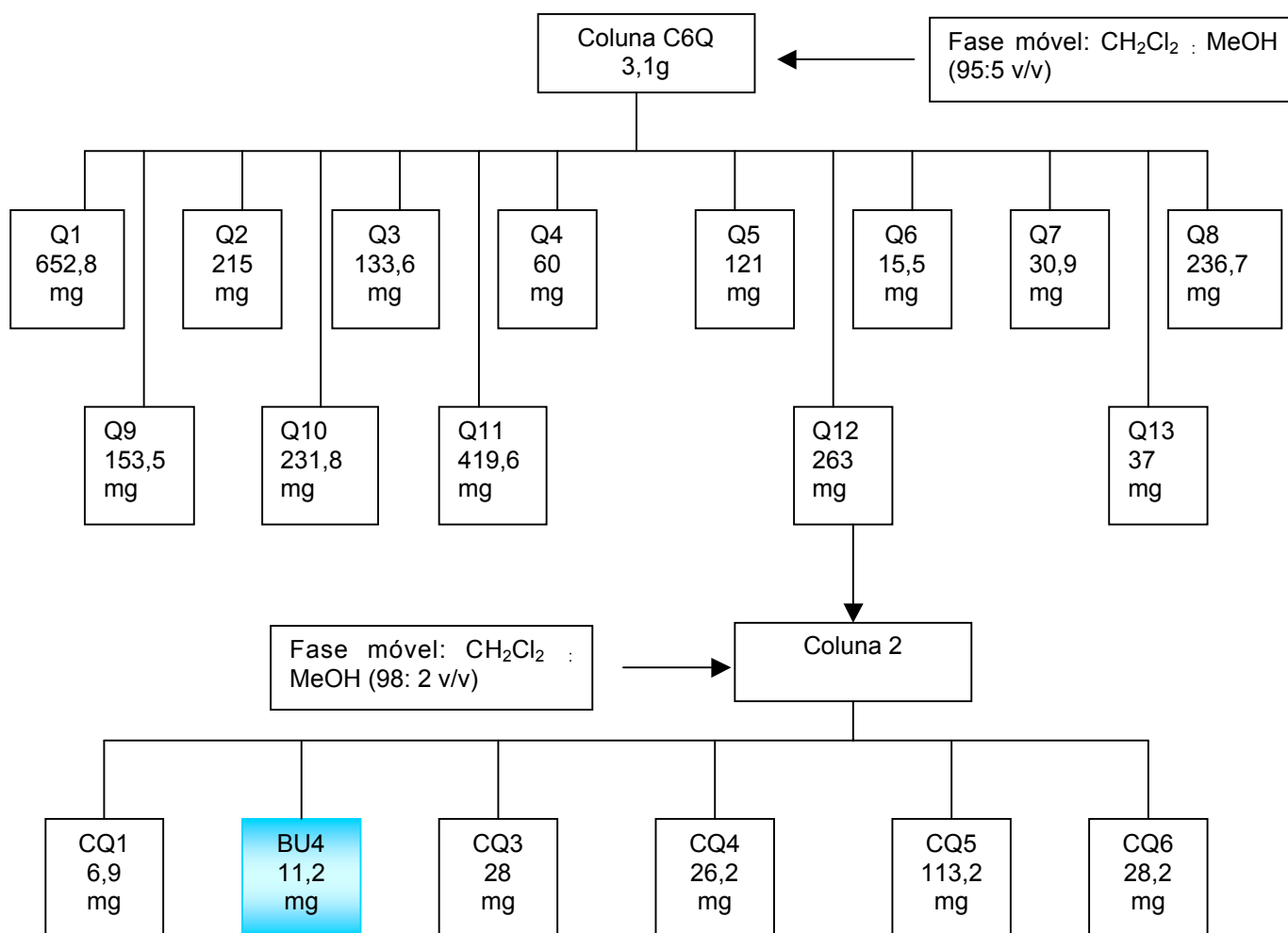


Figura 19: Esquema de isolamento da substância BU4.

#### 4.8.3 Isolamento da BU5

As frações CQ4 e CQ5 demonstradas na Figura 19, foram reunidas por possuírem as mesmas substâncias e mostraram-se semi puras. A fração resultante da junção das duas frações, foi purificada através de coluna cromatográfica em gel de sílica, tendo como fase móvel acetato de etila : éter de petróleo (1:2 v/v). A coluna cromatográfica rendeu cinco frações, sendo que as frações CQ4C e CQ4D apresentavam-se iguais e sendo assim as frações foram reunidas. A substância foi codificada como sendo a BU5.

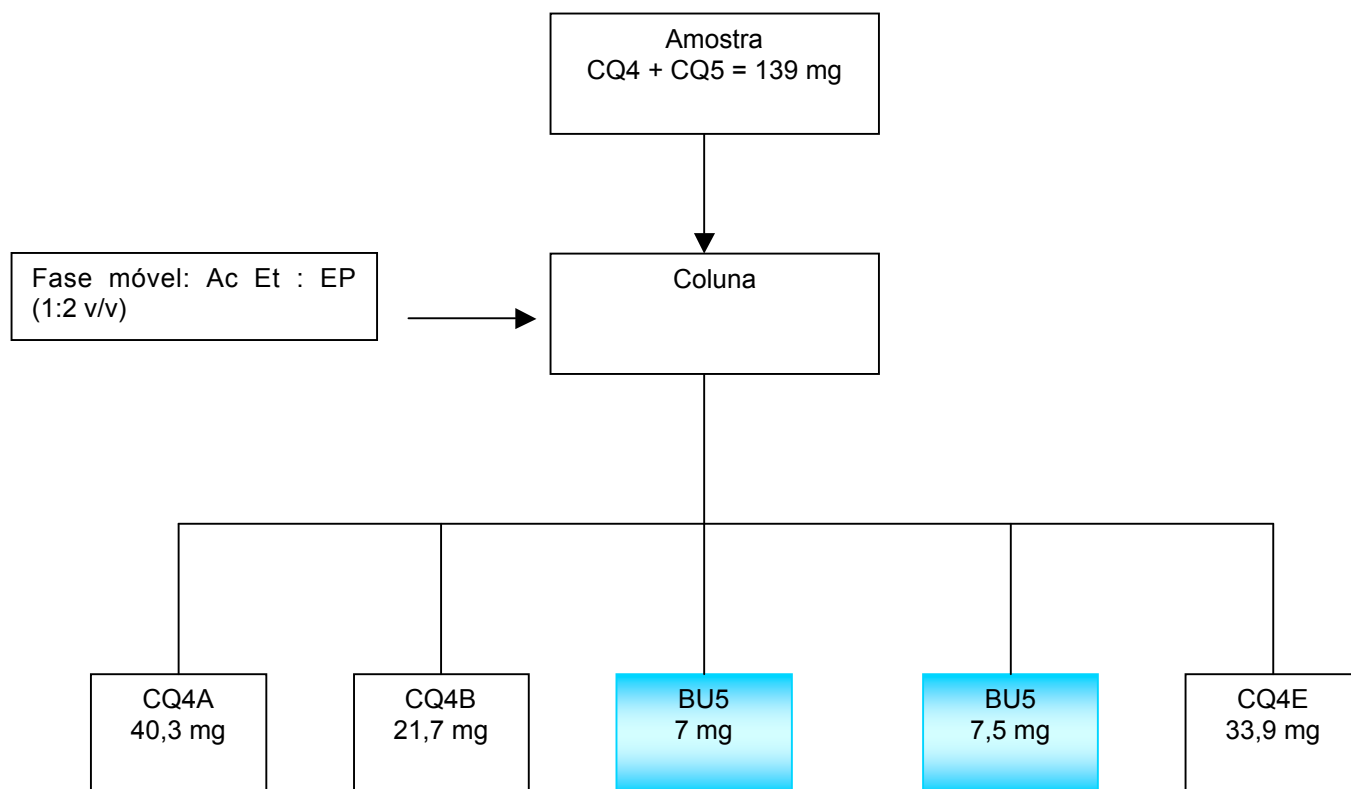


Figura 20: Esquema de isolamento da substância BU5.

#### 4.9 Reação de Libermann-Burchard

A reação de Libermann-Burchard (BRIESKORM; HOFMANN, 1964 apud SCHENKEL, 1980) foi realizada para verificação da identidade da substância BU3. Para reação utilizou-se uma alíquota da amostra, 1mL de anidrido acético e 1mL de ácido sulfúrico. A coloração observada permitiu diferenciar entre terpenos e esteróides. Para comparação utilizou-se o ácido ursólico e o  $\beta$ -sitosterol.

Triterpeno = rosa  $\Rightarrow$  vermelho  $\Rightarrow$  marrom

Esteróide = vermelho  $\Rightarrow$  violeta  $\Rightarrow$  azul  $\Rightarrow$  verde

#### 4.10 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos acetônicos de *B. uncinella*, *B. articulata*, *B. trimera*, *B. usterii*, *B. microcephala* e *B. spicata*.

A avaliação da atividade antioxidante foi feita com as seguintes espécies: *B. trimera*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. spicata*, *B. usterii* e *B. uncinella*. Houve duas etapas na análise da capacidade antioxidante dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis*. A primeira fase foi avaliar a capacidade que os extratos acetônicos possuem em seqüestrar radicais livres, através do teste com DPPH. A segunda fase foi a realização do teste de peroxidação lipídica, que analisou a potencial dos extratos acetônicos em inibir a peroxidação lipídica, induzida pelo radical ascorbila.

##### 4.10.1 Monitoramento do radical DPPH

A técnica consistiu na incubação dos extratos, em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 200  $\mu$ M, por 30 minutos a temperatura de 37 °C, com posterior leitura das absorbâncias (VIVOT et al., 2001). Foi feito um controle do solvente com dimetilsulfóxido e etanol, um controle 100% radical onde havia DPPH e o dimetilsulfóxido e adicionalmente, foi realizado um controle positivo com a

quercetina nas concentrações: 2,5/ 5/ 10/ 20/ 25 e 50  $\mu$ M, para comparação com os resultados obtidos com as amostras.

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido na proporção de 1:10. O ensaio para cada espécie foi feito com concentrações diferentes, isso de acordo com a capacidade de cada uma em seqüestrar o radical DPPH (Tabela 4).

Tabela 4: Concentrações de extratos acetônicos de espécies de *Baccharis* usadas no ensaio de DPPH.

Extrato acetônico das espécies de <i>Baccharis</i>	Concentrações das amostras ( $\mu$ g/mL)
<i>B. articulata</i>	100/250/400/500/750
<i>B. microcephala</i>	10/25/50/75/100
<i>B. spicata</i>	50/100/250/350/500
<i>B. trimera</i>	5/10/25/50/100/500
<i>B. uncinella</i>	100/250/400/500
<i>B. usterii</i>	50/100/250/500

As leituras das absorbâncias das amostras e dos controles foram feitas em 515 nm. Os percentuais de inibição da absorção de DPPH foram calculados através da comparação com o grupo controle de DPPH 100% (VIVOT et al., 2001).

#### 4.10.2 Avaliação da peroxidação lipídica

##### 4.10.2.1 Preparação de microsomas

Os fígados de ratos após terem sido retirados e lavados com solução de NaCl 0,9 g/l, foram mantidos no gelo para posterior pesagem e preparação dos microsomas.



Os microssomas foram obtidos pela homogenização do fígado e posterior centrifugação diferencial pela agregação com cálcio. A técnica de preparação dos microssomas consiste em homogenização dos fígados de ratos em uma solução de 10 mM de tampão Tris-sacarose (pH=7,4) contendo 17g %de tecido e centrifugação a 600g por 5 minutos a 4°C. A fração mitocondrial foi obtida centrifugando-se o sobrenadante a 12000g por 10 minutos. A fração microssomal resultou da precipitação do sobrenadante da fração anterior adicionando 80 mM de cloreto de cálcio. Finalmente, o precipitado (fração microssomal) foi lavado com 8 mL de uma solução contendo KCl 150 mM/Tris-HCl 10 mM (pH = 7,4) e centrifugado a 25000g por 15 minutos. Depois de lavados, os microssomas foram ressuspensos em tampão de conservação contendo 20% de glicerol (SCHENKMAN; CINTI, 1978 ). Uma alíquota foi separada para determinar a concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951) e o restante da fração microssomal foi congelado em criotubos de 1 mL em freezer a – 80°C para posterior utilização.

#### **4.10.2.2**      *Determinação da concentração de proteínas*

Este método tem como finalidade determinar a concentração de proteínas totais presente na amostra de microssomas, através do Método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Para o ensaio, foi utilizada uma solução aquosa padrão de albumina bovina 1mg/mL, uma solução alcalina composta por: 10g de carbonato de sódio e 2g de hidróxido de sódio para um volume total de 500 mL, tartarato de sódio 2%, sulfato de cobre 1%, reagente de Folin 2N diluído em água na proporção de 1 : 3 (v/v) e a amostra de microssomas. O método baseia-se na reação entre o  $\text{Cu}^{+2}$  com as ligações peptídicas das proteínas e a redução dos sais de fosfomolibdato-fosfotungstato do reagente de Folin, resultando em uma coloração azulada analisada espectrofotometricamente a 660 nm.

#### **4.10.2.3**      *Avaliação da lipoperoxidação induzida por radical ascorbila em microsossomas de fígado de rato*

Nesse ensaio ocorre a indução de peroxidação lipídica em membrana (microsossoma) através do radical ascorbila que foi produzido pela reação de ácido ascórbico 2,5 mM com sulfato ferroso 0,5 mM em tampão Tris-HCl 1 M. Na peroxidação lipídica ocorre a formação de produtos de degradação, sendo o principal deles, o dialdeído malônico. O experimento com ácido tiobarbitúrico (TBA) mede a concentração de dialdeído malônico livre (OHKAWA; OSHISHI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984). A peroxidação lipídica é determinada pela reação do dialdeído malônico com TBA, gerando um produto colorido (rosa), que é quantificado espectrofotometricamente a 535 nm (BIRD; DRAPER, 1984; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em todos os ensaios realizados, a concentração de proteínas foi mantida em 1mg/mL. Os extratos acetônicos, das diferentes espécies vegetais em estudo, foram diluídas em DMSO. Foram realizados os seguintes controles: basal 1, que continha apenas água; basal 2, que continha água e microsossomas; controle 100% peroxidação lipídica, que continha microsossomas e ferro-ascorbato; e controle positivo com quercetina. As reações foram realizadas em banho-maria a 37°C por 30 min, seguidas da adição de ácido tricloroacético (TCA 12%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%) e novamente incubados a 100°C por 15 min. Os extratos acetônicos das diferentes espécies de *Baccharis* foram testados em diferentes concentrações( Tabela 5).

Tabela 5: Concentrações dos extratos acetônicos, das espécies de *Baccharis*, usadas no ensaio de peroxidação lipídica.

<b>Espécies de <i>Baccharis</i></b>	<b>Concentrações dos extratos acetônicos ( µg/mL )</b>
<i>B. articulata</i>	100 /200 /250 /300 /400 /500 /700 /750
<i>B. microcephala</i>	10 /20 /25 /30 /40 /50 /60 /75
<i>B. spicata</i>	50 /100 /200 /250 /300 /400 /500
<i>B. trimera</i>	5 /10 /25 /50 /100
<i>B. uncinella</i>	50 /80 /150 /250 /400 /500
<i>B. usterii</i>	100 /200 /250 /300 /400 /500

A leitura foi realizada em 535 nm e os resultados foram expressos como percentuais da inibição na peroxidação lipídica, considerando os valores médios das absorbâncias das amostras e o controle 100% da peroxidação lipídica nos microssomas. O teste avaliou o dano celular induzido pelo radical ascorbila e a ação protetora dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA; OSHISHI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984; SANZ et al., 1994).

---

## **5 Resultados e Discussão**

### 5.1 Rendimentos dos extratos

Considerando a extração de *Baccharis uncinella* através do método de imersão em acetona por 3 minutos, o rendimento foi o seguinte (Tabela 6) :

Tabela 6: Rendimento do extrato acetônico de *Baccharis uncinella*.

<b>Espécie <i>Baccharis</i></b>	<b>Quantidade de partes aéreas inicial</b>	<b>Rendimento do extrato acetônico em (g)</b>	<b>Rendimento do extrato acetônico em (%)</b>
<i>B. uncinella</i>	342 g	33	9,6

De acordo com a partição do extrato acetônico (33 g) de *B. uncinella* com solventes de polaridade crescente (n – hexano, diclorometano, acetato de etila), foram obtidos os seguintes rendimentos (Tabela 7):

Tabela 7: Rendimento das frações da partição de *Baccharis uncinella* em (g) e em relação à planta e ao extrato acetônico seco.

<b>Fração Partição</b>	<b>Rendimento das frações em (g)</b>	<b>Rendimento das frações em (%) em relação à planta</b>	<b>Rendimento % das frações em (%) em relação ao extrato acetônico</b>
N – Hexano	0,57	0,16	1,7
Diclorometano	22,8	6,6	66,7
Acetato de Etila	3,2	0,94	9,8
Aquosa	1,3	0,4	4,0

Com relação aos extratos empregados na avaliação da atividade antioxidante, obtidos por imersão em acetona por 1 minuto, das espécies de *Baccharis* : *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. spicata*, *B. trimera*, *B. usterii* e *B. uncinella*, os rendimentos apresentados foram (Tabela 8):

Tabela 8: Rendimento da extração das espécies de *Baccharis* por imersão em acetona por 1 minuto.

Extratos acetônicos	Quantidade de partes aéreas inicial (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
<i>B. articulata</i>	13	1,30	10,0
<i>B. microcephala</i>	12,5	1,0	8,1
<i>B. spicata</i>	13	1,38	10,6
<i>B. trimera</i>	12,5	0,59	4,7
<i>B. uncinella</i>	13	1,57	12,0
<i>B. usterii</i>	13	0,25	1,9

Os rendimentos obtidos através da extração por imersão por 3 minutos, foram similares para algumas espécies como por exemplo, *B. trimera* 4,6% e *B. usterii* 2%, indicando assim, que o processo extrativo é realizado no primeiro minuto.

## 5.2 Análise cromatográfica das frações de *B. uncinella*

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das frações obtidas pelo processo de partição, conforme mostra a Figura 21, permitiu verificar que as frações acetato de etila e diclorometano, submetidas a revelação com reagente natural A (NP), são muito semelhantes em seus constituintes. Pode-se constatar neste sistema cromatográfico, a presença predominante de flavonóides, que são as substâncias que apresentam-se coloridas em amarelo.

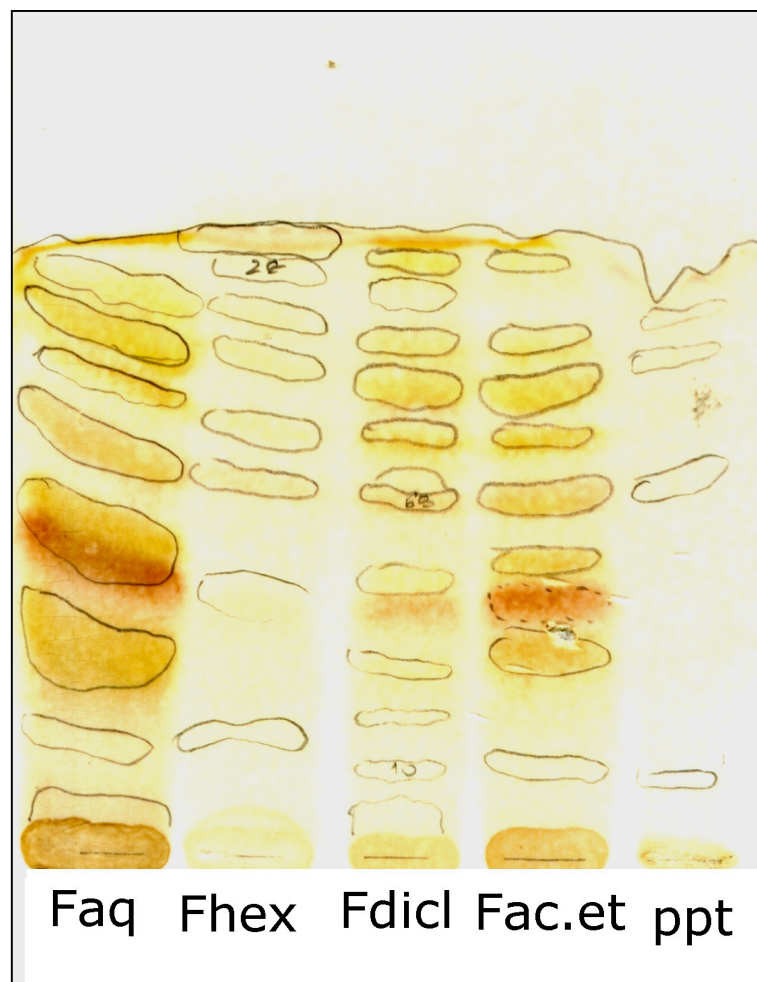


Figura 21: Análise cromatográfica das frações obtidas da partição de *Baccharis uncinella* – revelação com Reagente natural A

Fase móvel: diclorometano : metanol (98:2 v/v)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: reagente natural A e aquecimento a 100°C

Amostras: Faq – Fração aquosa

Fhex – Fração n-hexano

Fdicl – Fração diclorometano

Fac.et – Fração acetato de etila

Ppt - Precipitado

As frações obtidas do procedimento de partição também foram analisadas quanto a presença de terpenos, através de revelação com anisaldeído sulfúrico conforme ilustra a Figura 22.

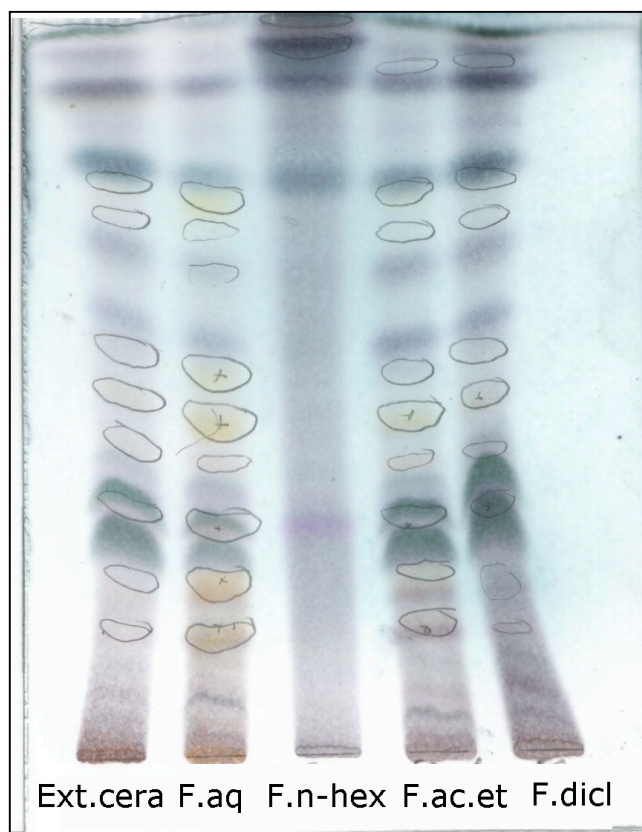


Figura 22: Análise cromatográfica das frações obtidas da partição de *Baccharis uncinella* – revelação com anisaldeído sulfúrico.

Fase móvel: diclorometano : metanol (96:4 v/v)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C

Amostras: Ext.cera – Extrato da cera

F.aq.- Fração aquosa

F.n-hex.- Fração n-hexano

F.ac.et.- Fração acetato de etila

F.dicl.- Fração diclorometano



### 5.3 Análise estrutural das substâncias isoladas

#### 5.3.1 Substância BU1

A substância BU1 foi obtida do extrato acetônico no momento da ressuspensão em metanol:água, onde ocorreu a presença de um precipitado. Para purificação e análise espectral, o precipitado foi acetilado e cromatografado, resultando na substância BU1A, cuja elucidação estrutural é descrita a seguir.

##### 5.3.1.1 Análise espectroscópica no Infravermelho

O espectro de IV (Figura 23) da substância BU1A apresenta uma banda de absorção de forte intensidade na região  $2946\text{ cm}^{-1}$  e bandas de média intensidade em  $1460\text{ cm}^{-1}$  e  $1330\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam o estiramento C-H. Nas regiões de  $1730\text{ cm}^{-1}$  e  $1690\text{ cm}^{-1}$  observa-se bandas de forte intensidade que caracterizam carbonilas. Em  $1250\text{ cm}^{-1}$  ocorre uma banda de absorção de intensidade forte que caracteriza o estiramento C-O.

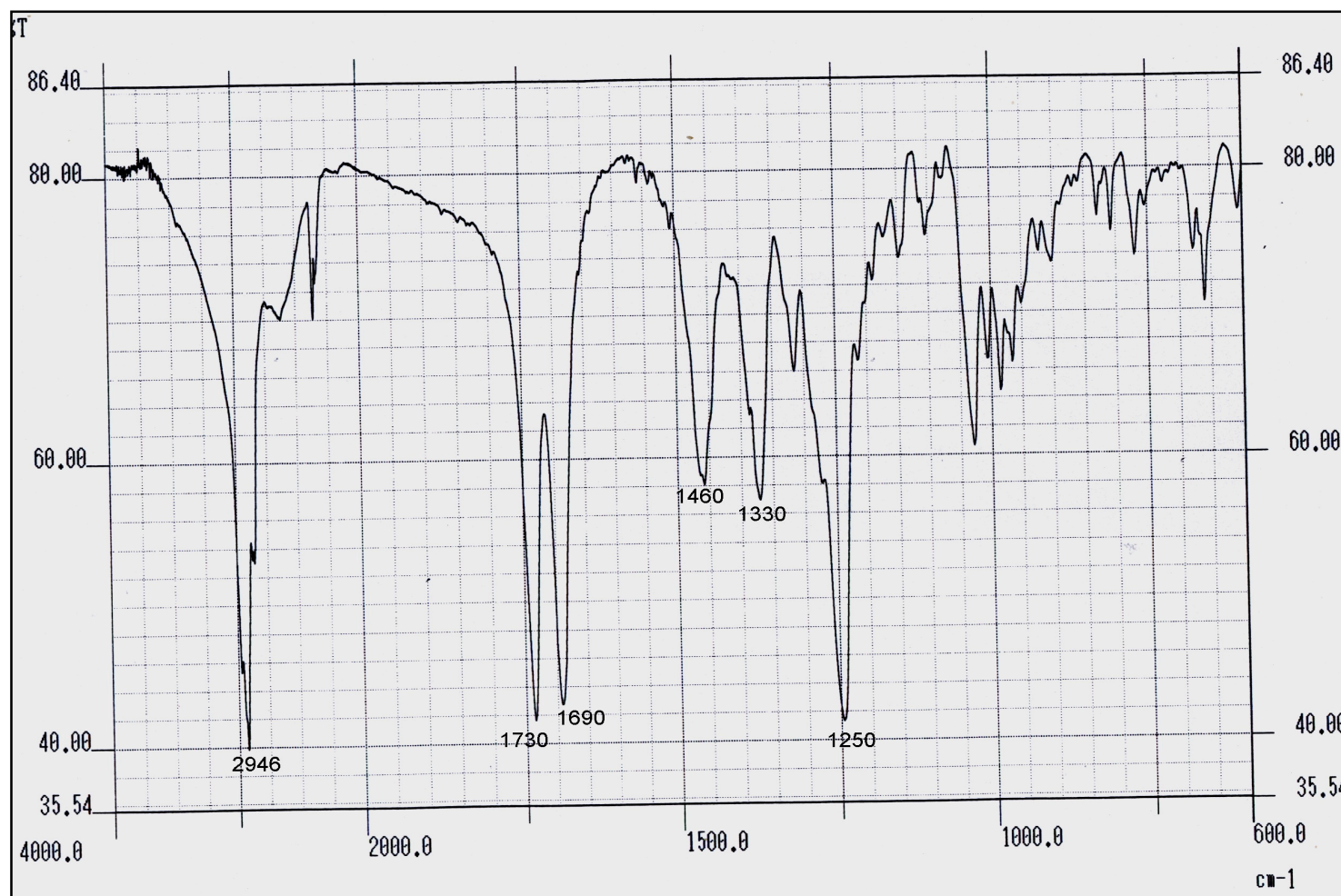


Figura 23: Espectro de infravermelho da substância BU1A em KBr.

#### **5.3.1.2** *Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU1A*

Através dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT, CH-COSY (HMQC) e HH-COSY da substância acetilada BU1, foi possível realizar a atribuição dos átomos de carbono e de hidrogênio que compõem a estrutura da substância BU1A. Pelos espectros de correlação foram observadas as conectividades entre os carbonos e seus respectivos prótons.

Na Figura 24 pode-se observar o espectro totalmente desacoplado de RMN- $^{13}\text{C}$  da substância BU1A. O espectro evidencia a presença de 30 átomos de carbono, com dois carbonos adicionados da acetila, onde a caracterização de cada tipo de carbono da molécula foi auxiliado com a análise do espectro DEPT (Figura 25). O espectro de DEPT (Figura 25), sinaliza a presença metilas ( $-\text{CH}_3$ ), grupos metinos ( $-\text{CH}$ ) e metilenos ( $-\text{CH}_2$ ).

Os sinais correspondentes aos metilenos ( $-\text{CH}_2$ ) aparecem em campo mais alto e voltados para cima, os sinais correspondentes às metilas ( $-\text{CH}_3$ ) aparecem em campo mais alto e voltados para baixo, os sinais que correspondem aos carbonos terciários ( $-\text{CH}$ ) encontram-se em campo mais baixo e voltados para baixo e os sinais de carbono quaternário ( $\text{C}_\text{q}$ ) não aparecem, sendo que estes foram identificados por comparação com o espectro totalmente desacoplado observado na Figura 24. Analisando o espectro de DEPT e comparando com o espectro desacoplado pode-se caracterizar os 30 átomos de carbonos (Tabela 9):

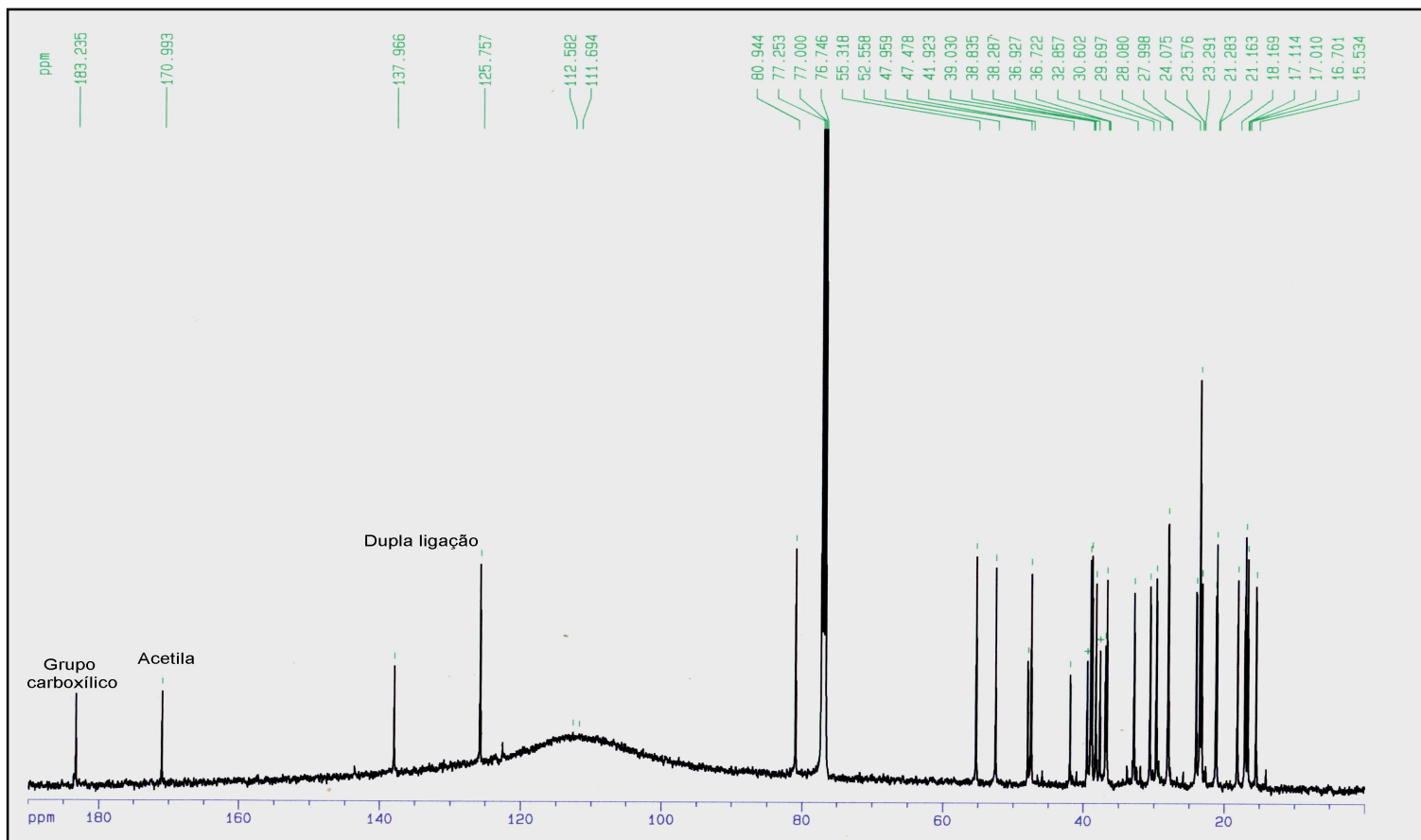


Figura 24: Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância BU1A a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

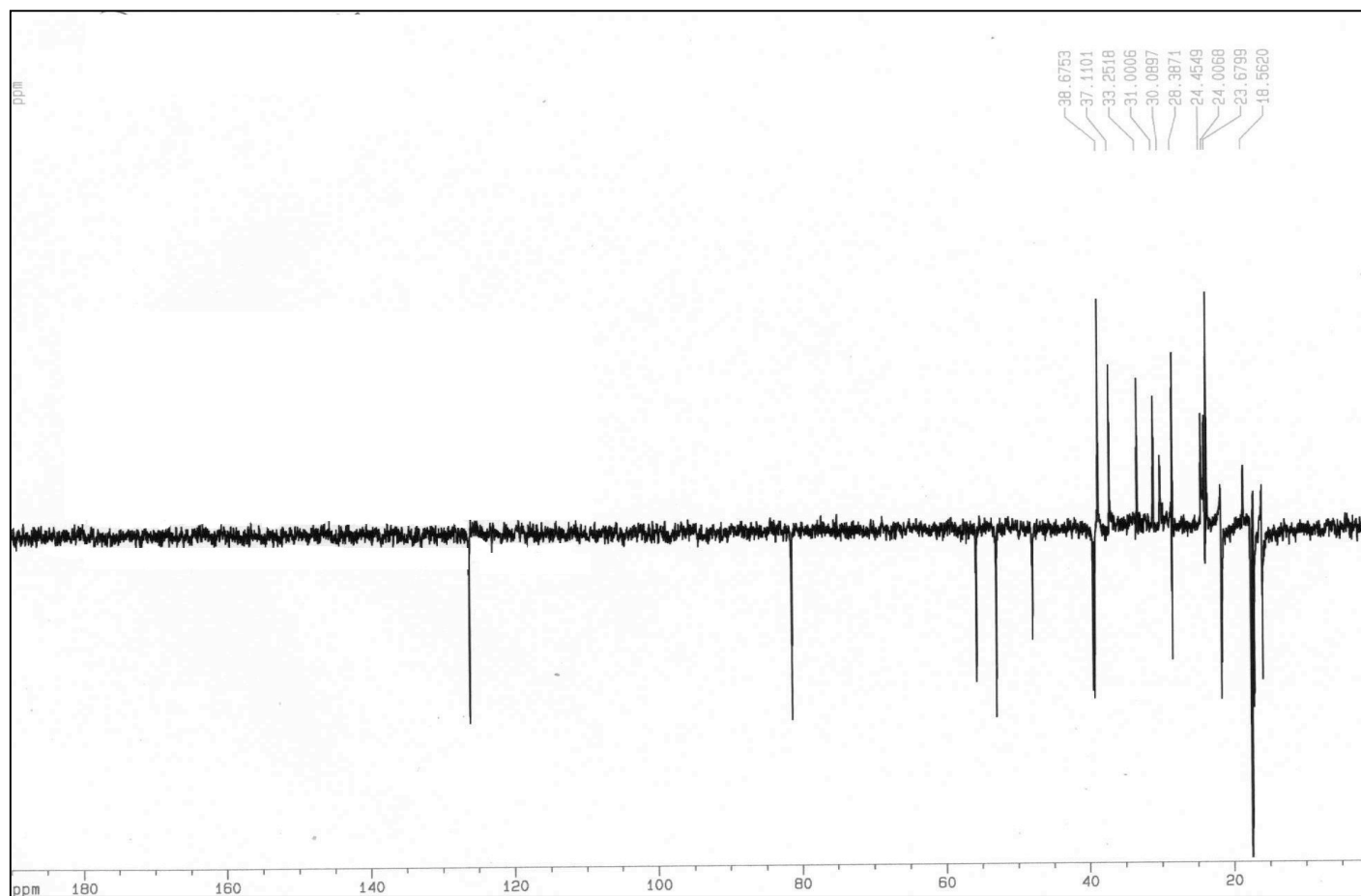


Figura 25: Espectro RMN-DEPT da substância BU1A a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

Tabela 9: Análise do espectro DEPT, caracterização dos tipos de carbonos.

Carbono	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub>	-CH	C <sub>q</sub>
$\Sigma = 30$	7	9	7	7

No espectro desacoplado o sinal em  $\delta_c$  183,2 indica a presença de um grupamento carboxílico livre. O espectro mostra sinais em  $\delta_c$  125,7 e  $\delta_c$  137,9 sugerindo insaturação do tipo (-CH=C<). Essa insaturação foi confirmada pelo sinal no espectro RMN -  $^1H$  onde o deslocamento  $\delta_H$  5,3 apresenta-se como um tripleto. Uma outra característica importante no espectro de RMN -  $^{13}C$  (Figura 24), são os sinais de ressonância em  $\delta_c$  170,9 e  $\delta_H$  2,1 correspondentes ao grupamento acetila. No espectro de correlação H-H (Figura 29) observa-se que o sinal em  $\delta_H$  4,5, apresenta-se como um multipletto, representa o H-C<sub>3</sub> e este apresenta uma correlação com o sinal em  $\delta_H$  2,1 caracterizando a acetila, isto evidencia que a acetila está presente no C<sub>3</sub>. Em  $\delta_H$  2,2 há um sinal de dubleto que caracteriza o H-18, comum nos triterpeno de núcleo ursano (HUNG; YEN, 2001; LEITE et al., 2001). Esse conjunto de dados indica que a substância BU1A é um ácido triterpênico. Os ácidos triterpênicos mais comuns são o ácido oleanólico e ursólico e estão presentes em espécies do gênero *Baccharis*.

A comparação com dados da literatura (LIN et al., 1987; LEITE et al., 2001 e TAKETA, 2001) para o ácido ursólico, confirmam para a substância BU1A a estrutura do ácido ursólico com hidroxila acetilada na posição C<sub>3</sub> (Tabela 10).

Tabela 10: Valores atribuídos aos carbonos da estrutura da substância BU1A, comparados com dados da literatura para o ácido ursólico.

Nº - C	CH <sub>n</sub> DEPT	δ <sub>c</sub>	δ <sub>c</sub> (LIN et al., 1987) <sup>a)</sup>	δ <sub>c</sub> (LEITE et al., 2001) <sup>b)</sup>	δ <sub>c</sub> (TAKETA, 2001) <sup>c)</sup>
1	CH <sub>2</sub>	38,3	3,0	38,3	38,4
2	CH <sub>2</sub>	28,0	27,2	27,0	24,6
3	CH	80,9	78,2	76,8	80,9
4	Cq	37,7	38,8	36,3	38,0
5	CH	55,2	55,2	54,8	55,7
6	CH <sub>2</sub>	18,2	18,3	18,0	18,6
7	CH <sub>2</sub>	32,9	33,0	32,7	33,5
8	Cq	39,5	39,5	39,4	40,0
9	CH	47,5	47,5	47,0	47,9
10	Cq	36,9	36,9	38,2	37,2
11	CH <sub>2</sub>	23,3	17,1	22,8	23,7
12	=CH	125,8	125,2	124,6	125,6
13	=C	137,9	138,3	138,2	139,4
14	Cq	41,9	42,0	41,6	42,6
15	CH <sub>2</sub>	28,1	28,2	27,5	28,8
16	CH <sub>2</sub>	24,1	24,2	23,8	25,0
17	Cq	47,9	47,5	46,8	48,2
18	CH	52,6	52,7	52,4	53,6
19	CH	38,8	39,1	38,5	39,5
20	CH	39,0	38,8	38,4	39,6
21	CH <sub>2</sub>	30,6	30,7	30,2	31,2
22	CH <sub>2</sub>	36,7	36,7	36,5	37,6
23	CH <sub>3</sub>	29,7	28,0	28,2	28,3
24	CH <sub>3</sub>	15,5	15,7	15,2	17,1
25	CH <sub>3</sub>	16,7	15,4	16,1	15,7
26	CH <sub>3</sub>	17,0	17,0	16,9	17,5
27	CH <sub>3</sub>	23,6	23,5	23,3	24,1
28	O=C-O	183,2	179,9	178,2	180,1
29	CH <sub>3</sub>	17,0	23,2	17,0	17,7

Nº - C	CH <sub>n</sub> DEPT	δ <sub>c</sub>	δ <sub>c</sub> (LIN et al., 1987) <sup>a)</sup>	δ <sub>c</sub> (LEITE et al., 2001) <sup>b)</sup>	δ <sub>c</sub> (TAKETA, 2001) <sup>c)</sup>
30	CH <sub>3</sub>	21,2	21,2	21,0	21,6
3-OAc		170,9			21,3/170,7

a) RMN - <sup>13</sup>C a 100 MHz (CDCl<sub>3</sub>)

b) RMN - <sup>13</sup>C a 100 MHz (DMSO - d<sub>6</sub>)

c) RMN - <sup>13</sup>C a 125/500 MHz (CDCl<sub>3</sub>: MeOD - 8:2).

A Tabela 10 compara os valores obtidos no espectro de RMN-<sup>13</sup>C para a substância BU1A com os valores da literatura. Observa-se que os valores são semelhantes e assim confirma que a substância isolada trata-se de ácido ursólico (Tabela 10). Adicionalmente, a identidade da substância BU1A foi assegurada através da comparação cromatográfica com substância autêntica (TAKETA, 2001)<sup>a</sup>, observe Figura 30.

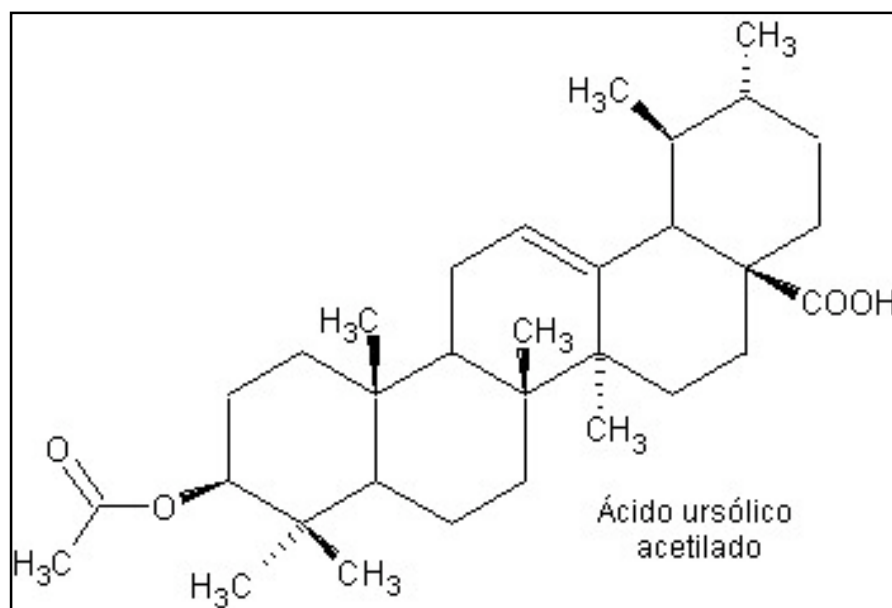


Figura 26: Estrutura da substância BU1A - ácido ursólico acetilado.

<sup>a</sup> Amostra autêntica cedida pelo Dr. Alexandre Cardoso Taketa



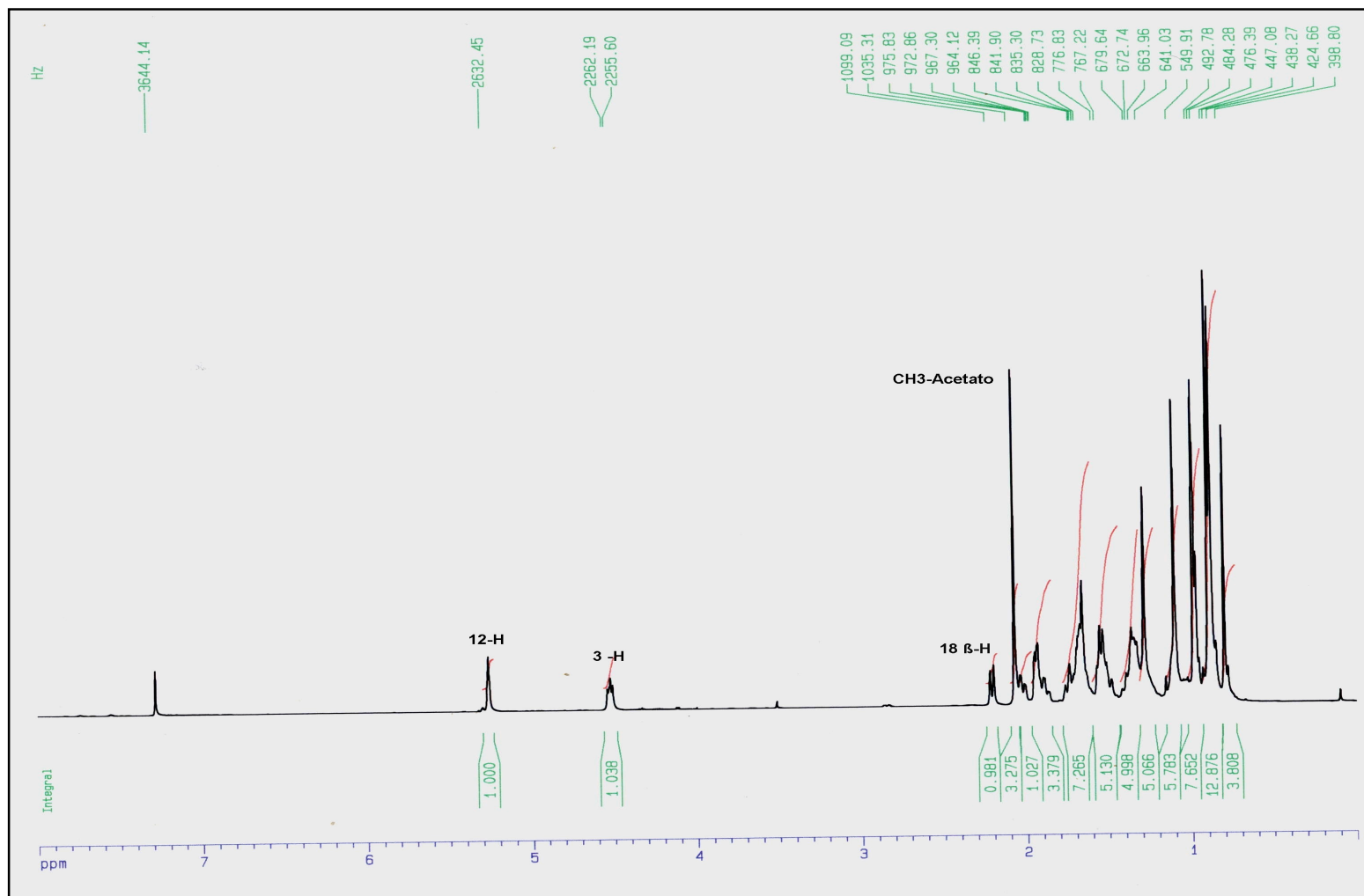


Figura 27: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da substância BU1A a 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>).

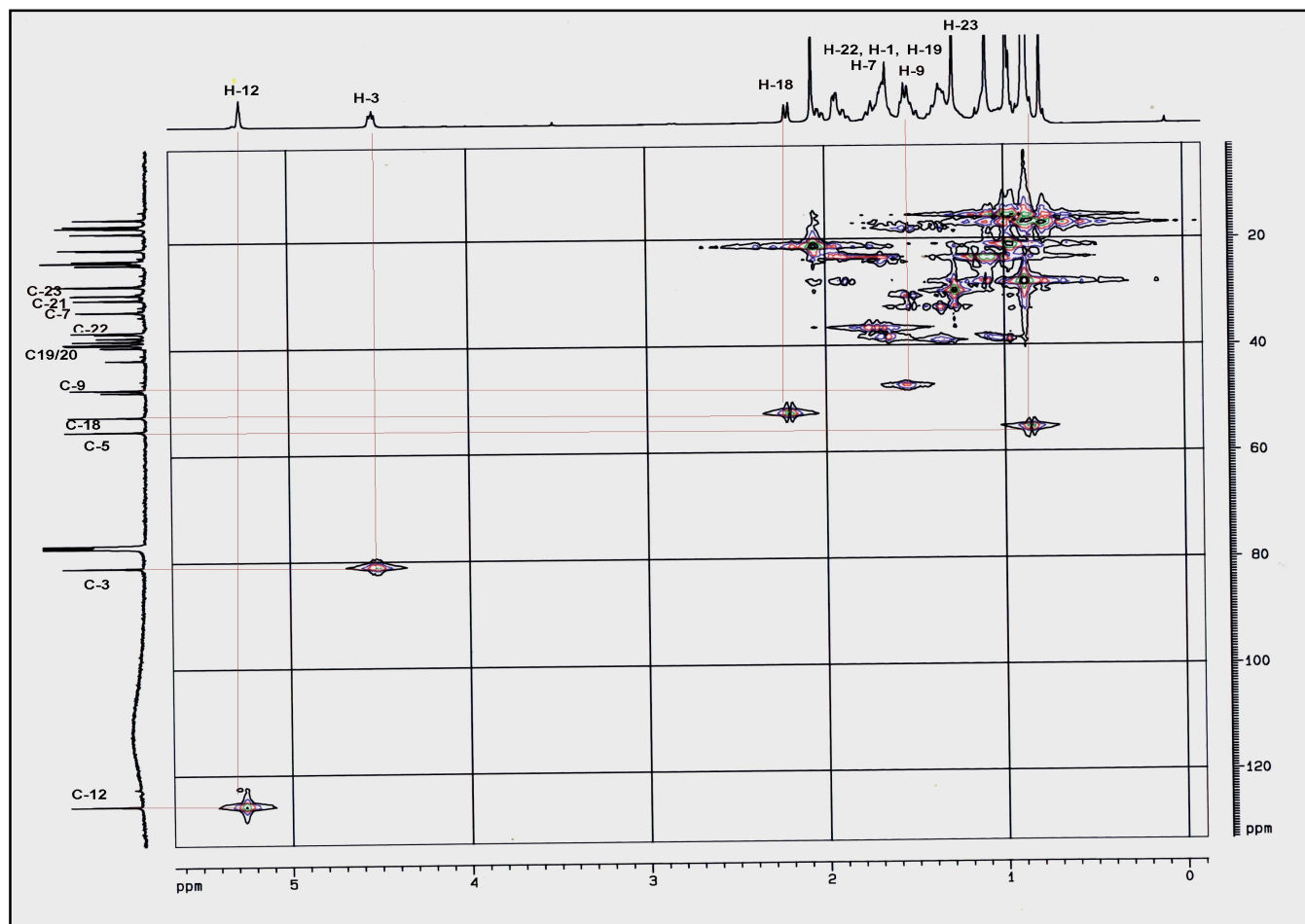


Figura 28: Espectro de correlação de RMN CH-COSY (HMQC) da substância BU1A a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

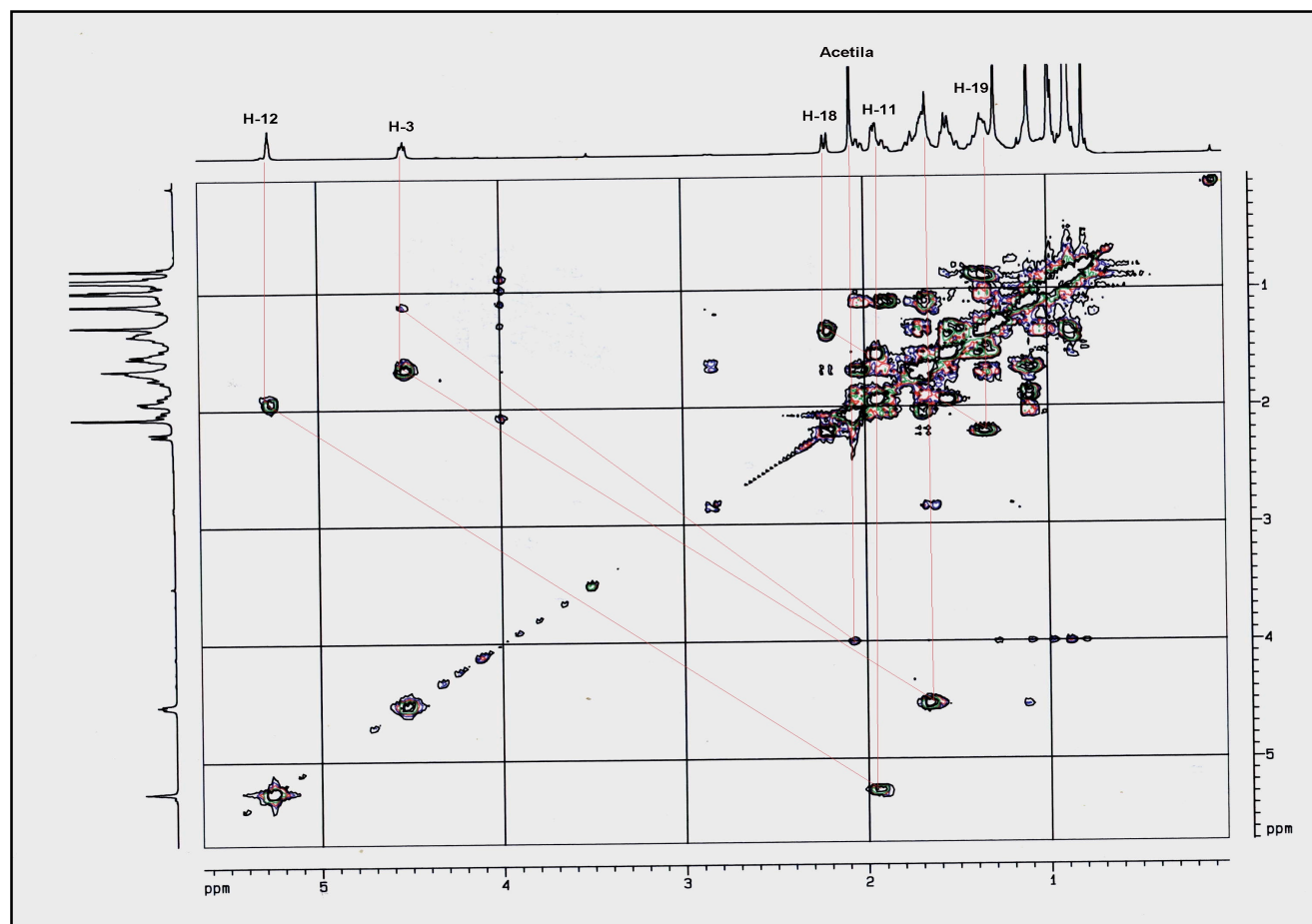


Figura 29: Espectro de correlação RMN HH – Cosy da substância BU1A a 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>).

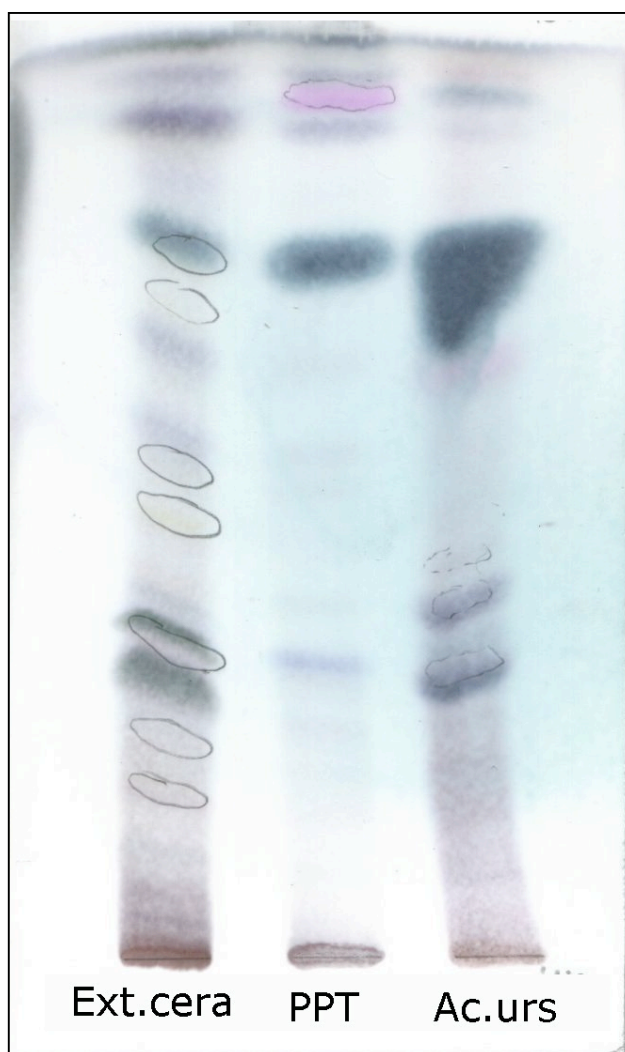


Figura 30: Análise cromatográfica do precipitado da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* frente a substância autêntica de ácido ursólico.

Fase móvel: diclorometano : metanol (96:4 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: Ext. cera – Extrato de cera

PPT – Precipitado

Ac.urs. – Ácido ursólico

De acordo com a Figura 30 pode-se observar que a substância que predomina no precipitado é o ácido ursólico e dessa forma, também confirma a identidade da substância BU1A. Na literatura há relatos da ocorrência do ácido ursólico na cera epicuticular em algumas espécies, como espécies de *Sedum* (STEVENS et al., 1994), *Rubus idaeus* L. e *Crataegus monogyna* Jacq. (GRIFFITHS et al., 2000) e *Ilex brevicuspis* (TAKETA, 1997).

### **5.3.2      Análise da substância BU3**

A substância BU3 foi obtida através da purificação da fração diclorometano, como ilustra Figura 18.

#### **5.3.2.1      Análise espectroscópica no Infravermelho da substância BU3**

De acordo com o espectro de infravermelho da substância BU3 (Figura 31) pode-se constatar a presença de uma banda de média intensidade que ocorre na região entre 3600 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  sugerindo a presença de hidroxila na molécula da substância BU3. Em 1100  $\text{cm}^{-1}$  há uma banda de média intensidade indicando a presença de ligação C-O, assim, confirma a possibilidade de hidroxila na molécula da substância BU3.

No espectro ainda há uma banda de absorção, discreta, na região de 1650  $\text{cm}^{-1}$  que sinaliza a presença de dupla ligação na molécula da substância BU3.

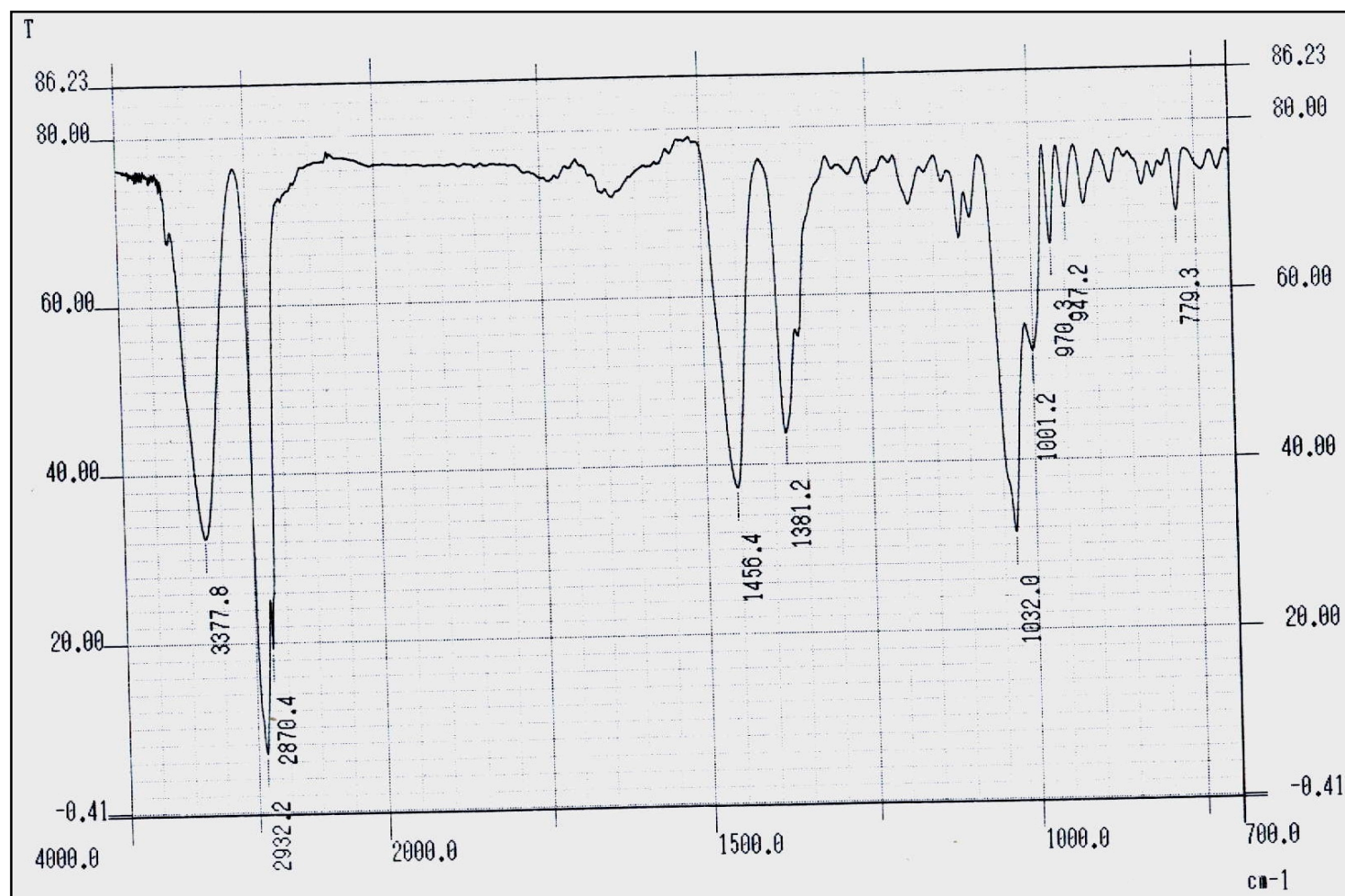


Figura 31: Espectro de Infravermelho da substância BU3 em KBr.

### 5.3.2.2 *Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU3.*

Através de análises dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado, foi possível a obtenção de importantes informações sobre a estrutura da substância BU3. O espectro DEPT forneceu informações sobre os tipos de carbonos presentes na estrutura e o espectro de correlação C-H evidenciou as correlações existentes entre os prótons e carbonos na molécula.

Analizando o espectro de RMN $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 32) , verificou-se que a estrutura da substância BU3 é composta por 30 átomos de carbonos. A identificação dos tipos de carbono foi realizada através do DEPT (Figura 34) que comparando com a análise do espectro totalmente desacoplado (Figura 32 e Figura 33) pode-se atribuir os tipos de carbonos, apontados na Tabela 11 .

Tabela 11: Análise do espectro DEPT, definição das metilas, metilenos, metinos e carbono quaternário da substância BU3.

Carbono	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub>	-CH	C <sub>q</sub>
$\Sigma = 30$	8	8	8	6

O espectro de RMN - $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 32) sugere que na estrutura da substância BU3 há a presença de dupla ligação, isto devido aos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  138,0 e 125,2. Essa possibilidade é confirmada com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,2 no espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 35) em que apresenta-se como um dubleto de dubleto.



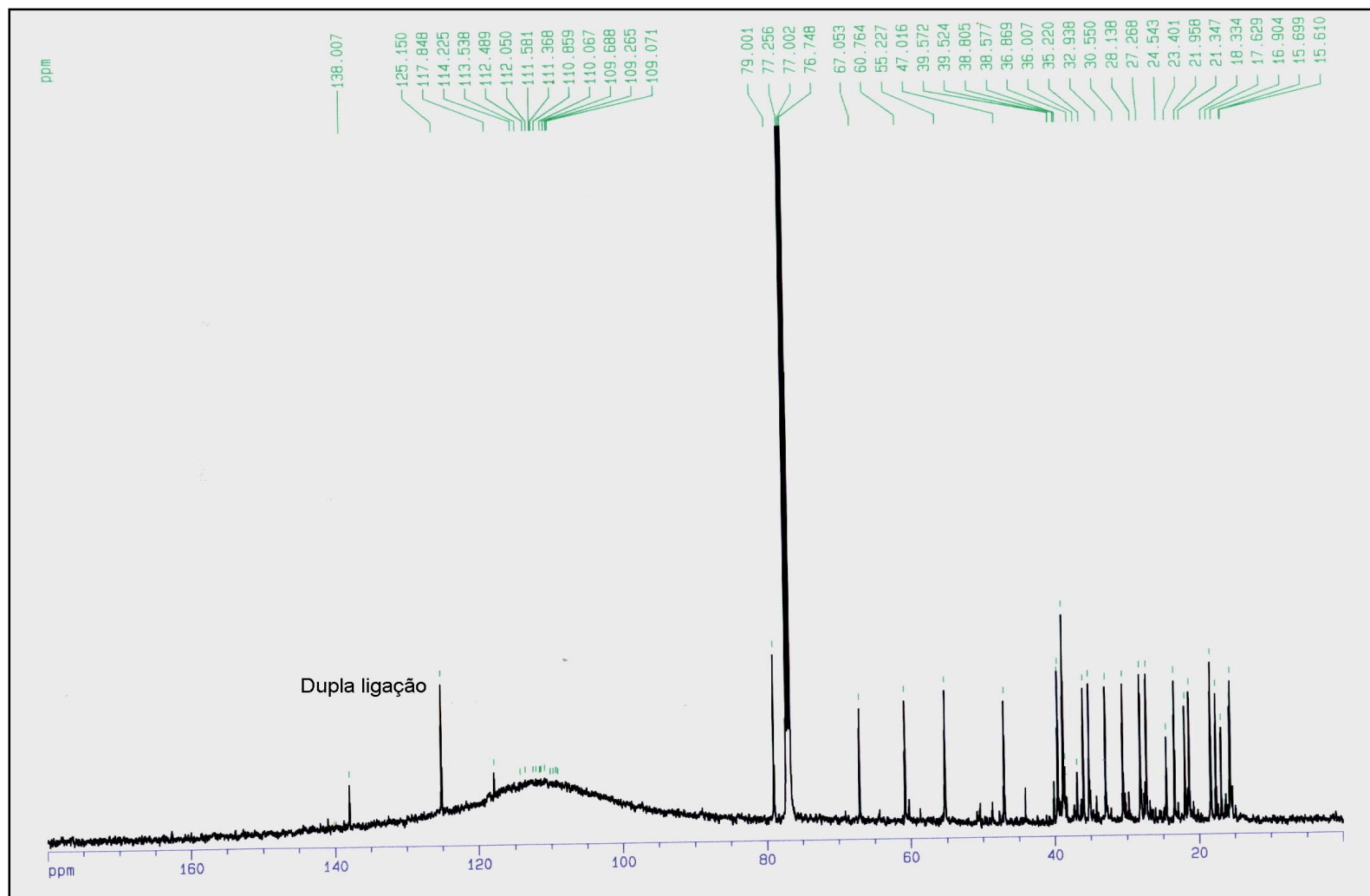


Figura 32: Espectro RMN -  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).



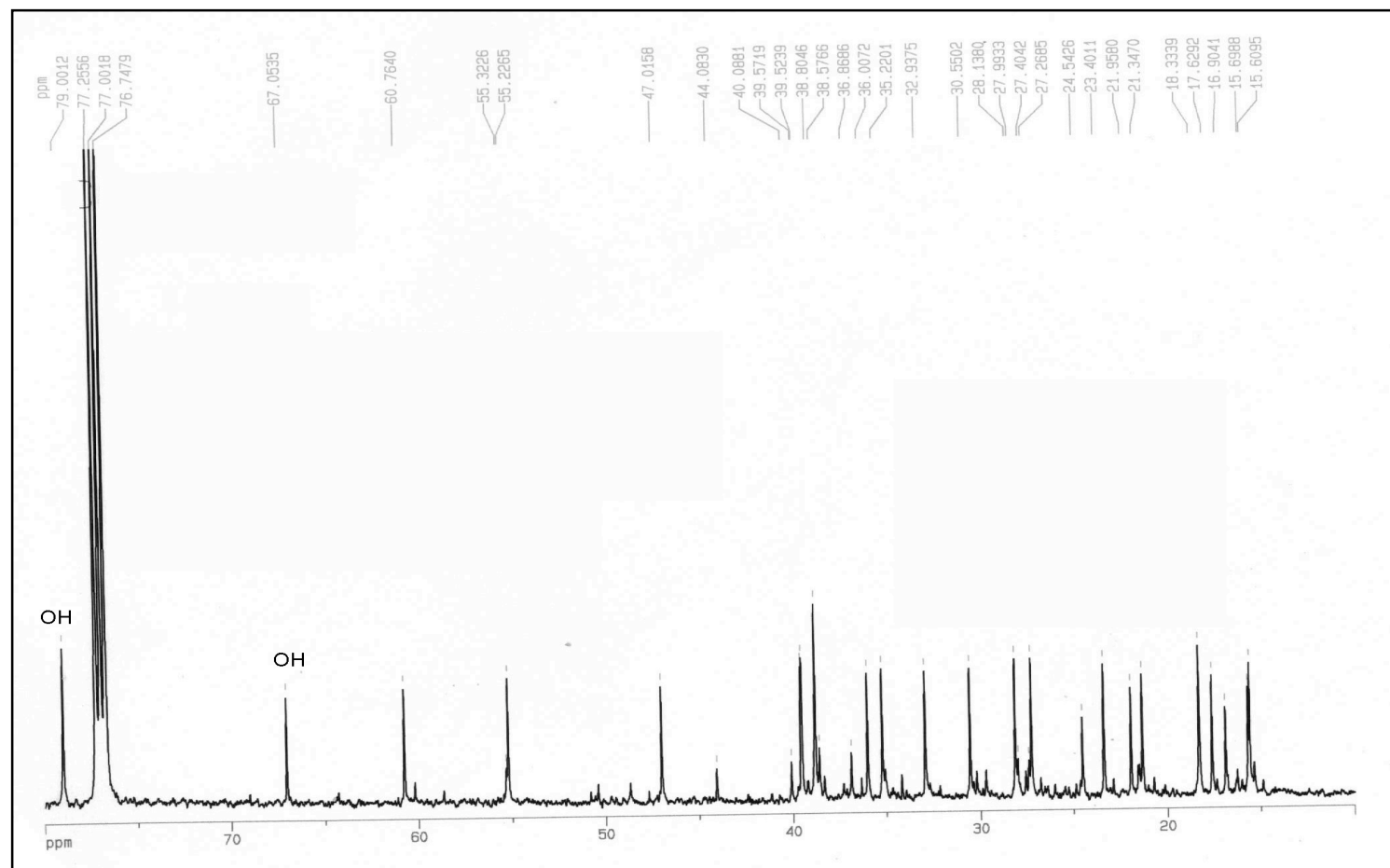


Figura 33: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  ampliado da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

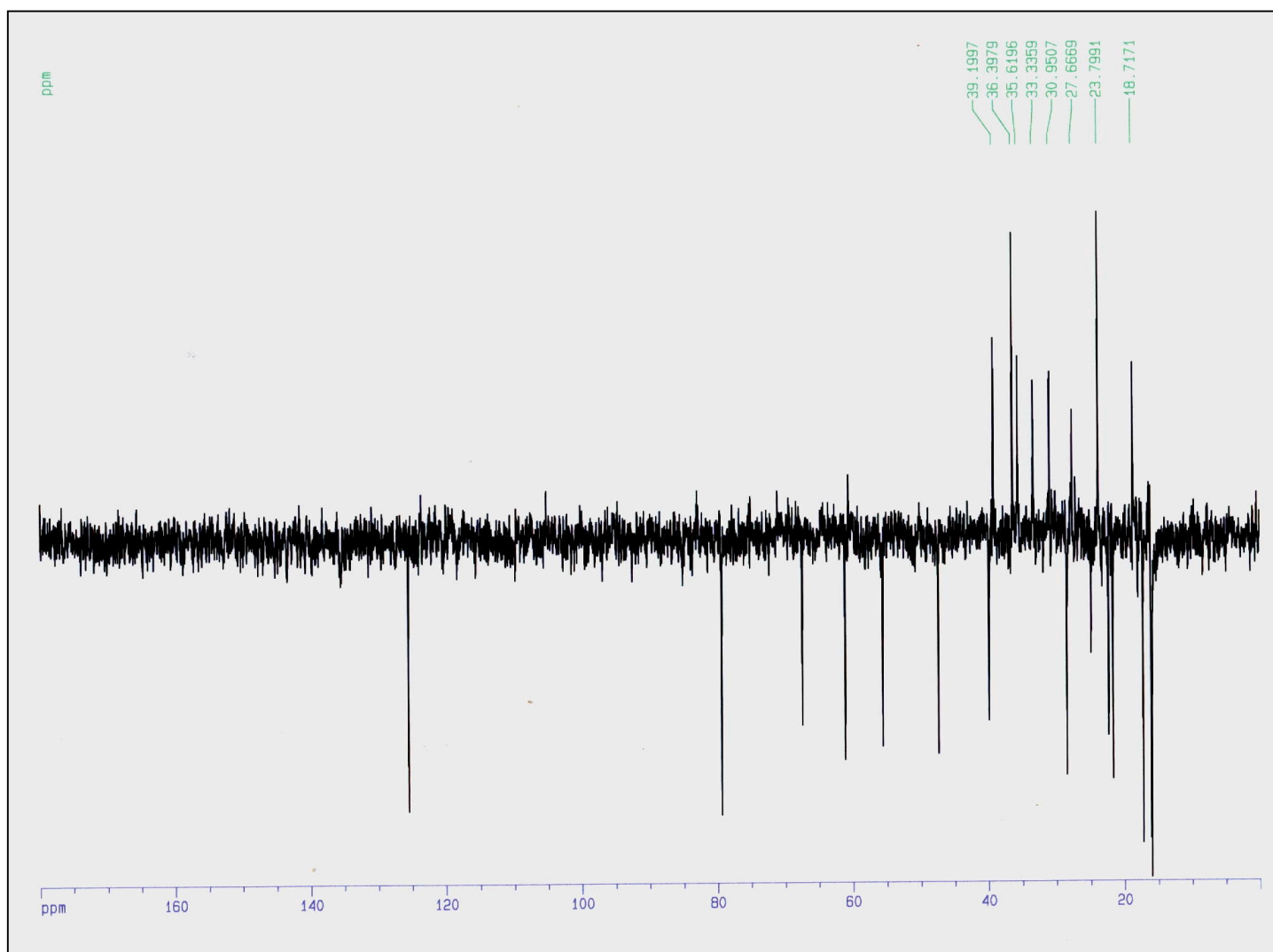
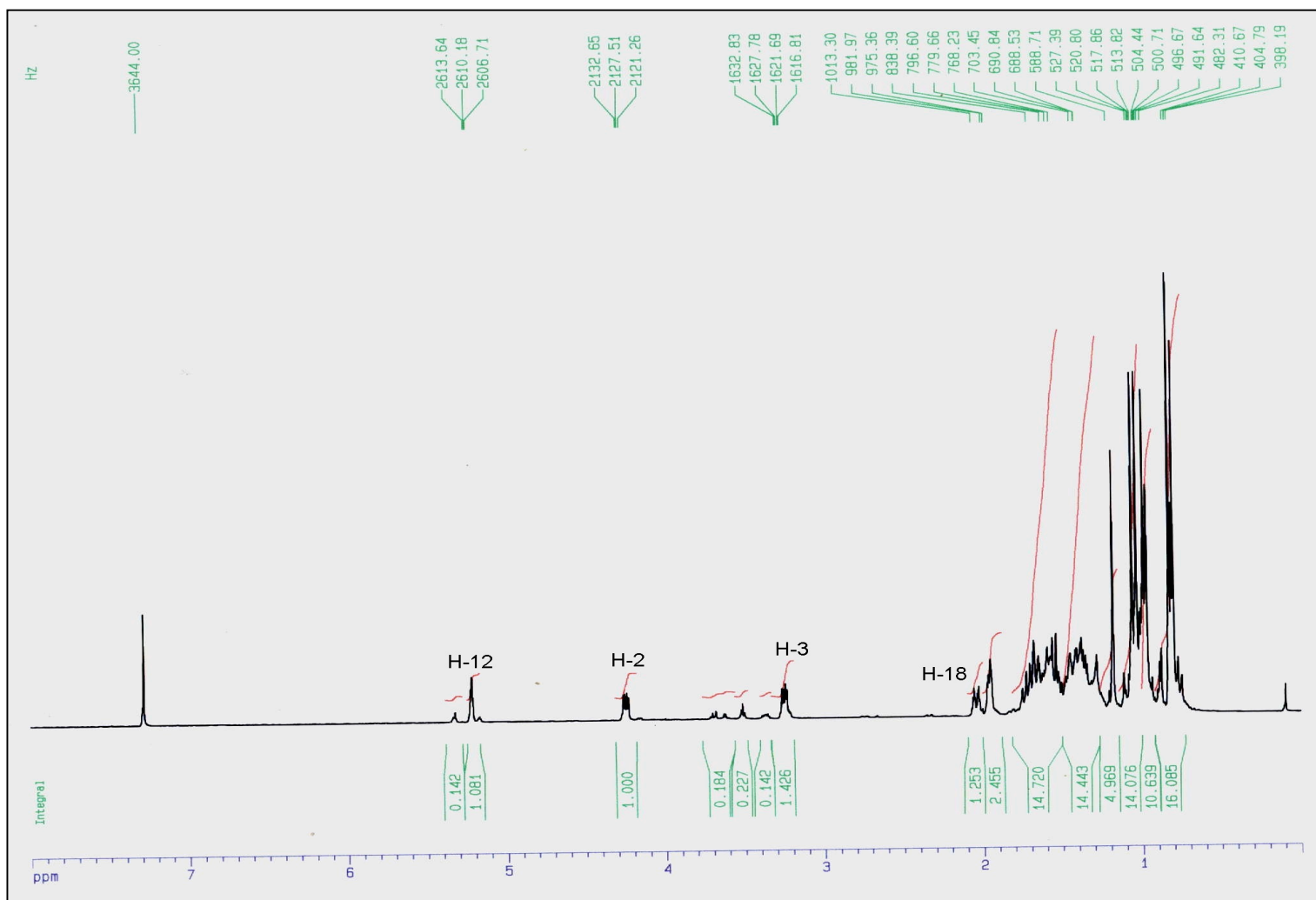


Figura 34: Espectro RMN - DEPT da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

Figura 35: Espectro RMN -  $^1\text{H}$  da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

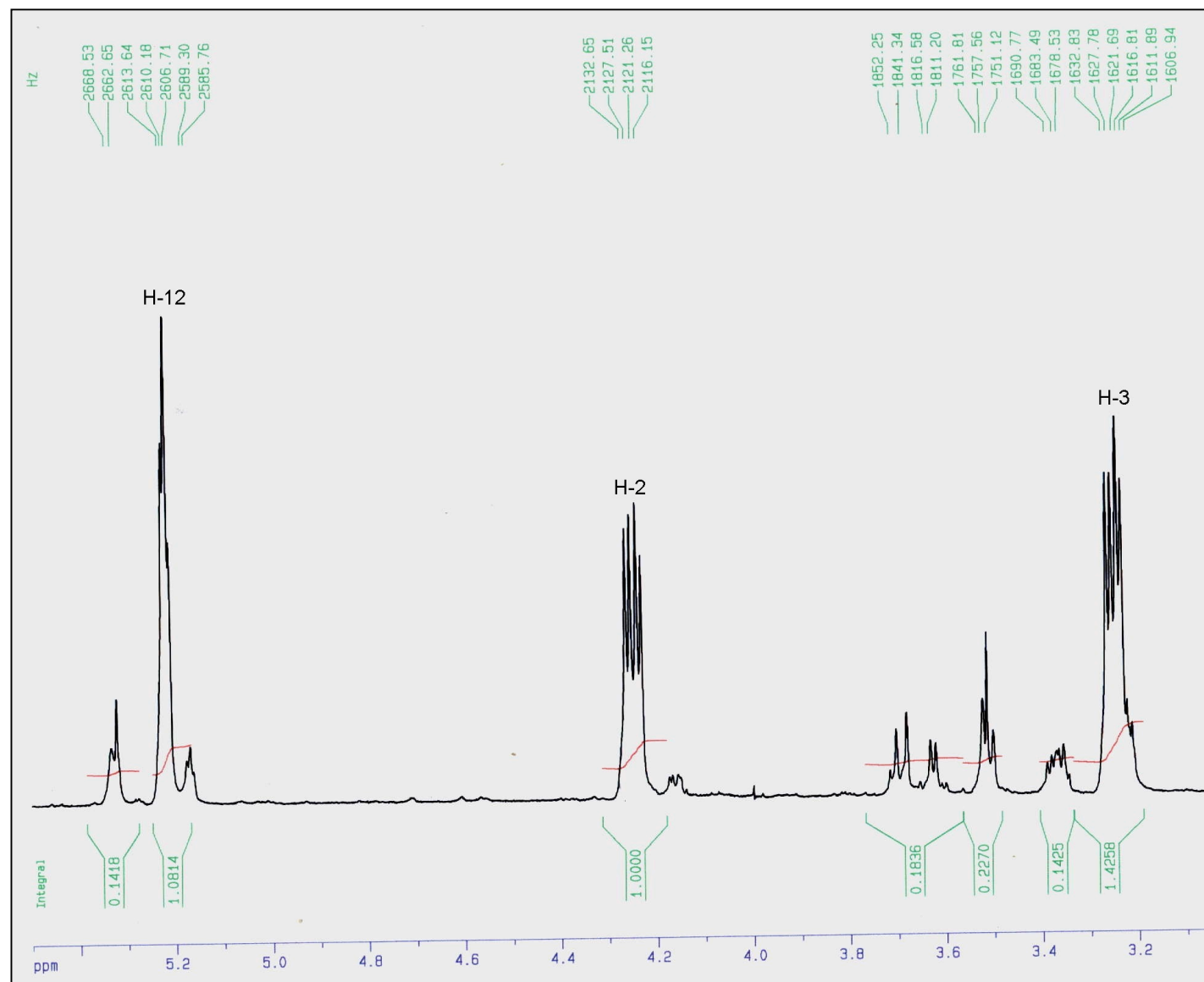


Figura 36: Espectro RMN -  $^1\text{H}$  da substância BU3 ampliado na região entre  $\delta_{\text{H}}$  3,0 e  $\delta_{\text{H}}$  5,0 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

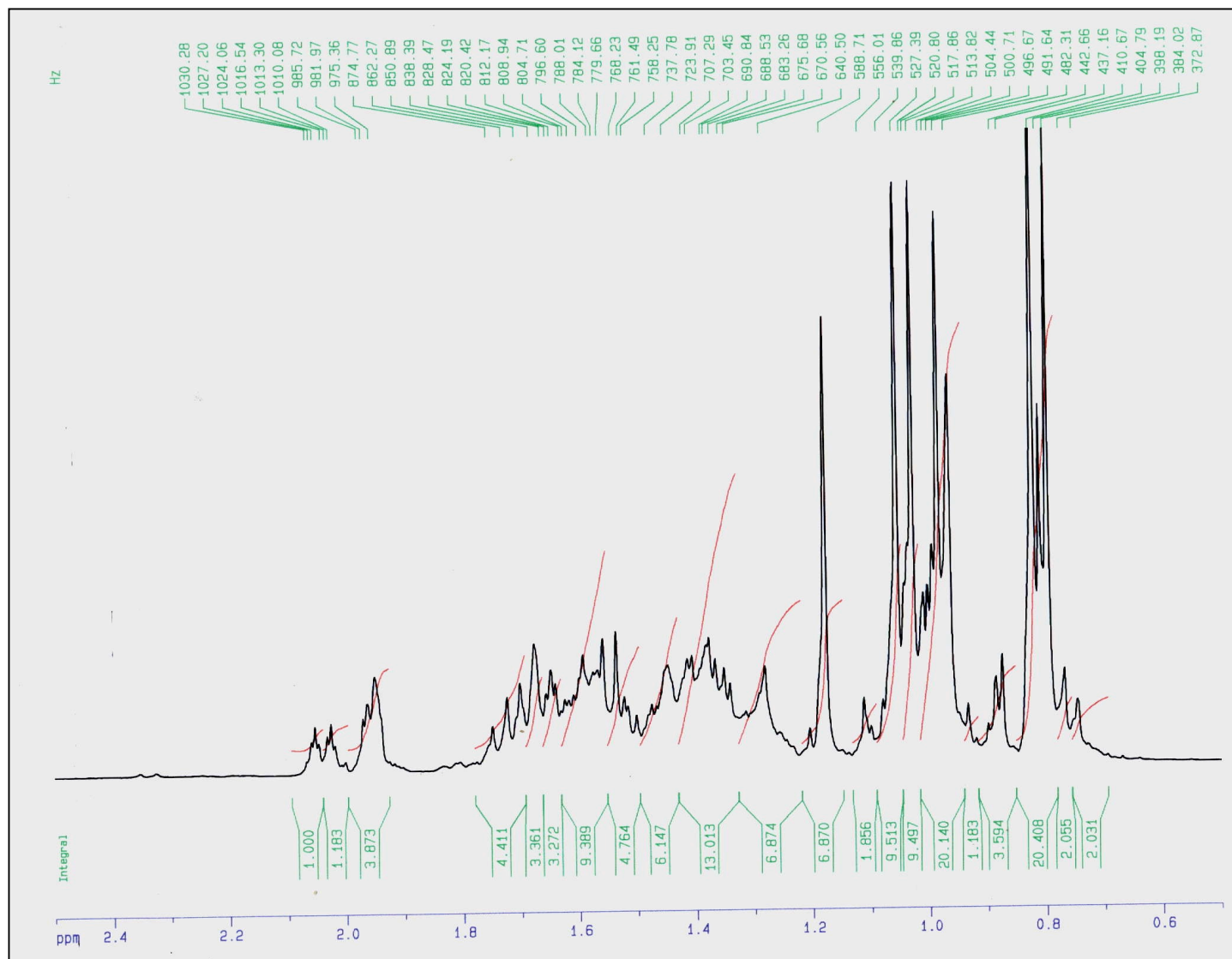


Figura 37: Espectro RMN -  $^1\text{H}$  da substância BU3 ampliado na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0 e  $\delta_{\text{H}}$  2,4 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

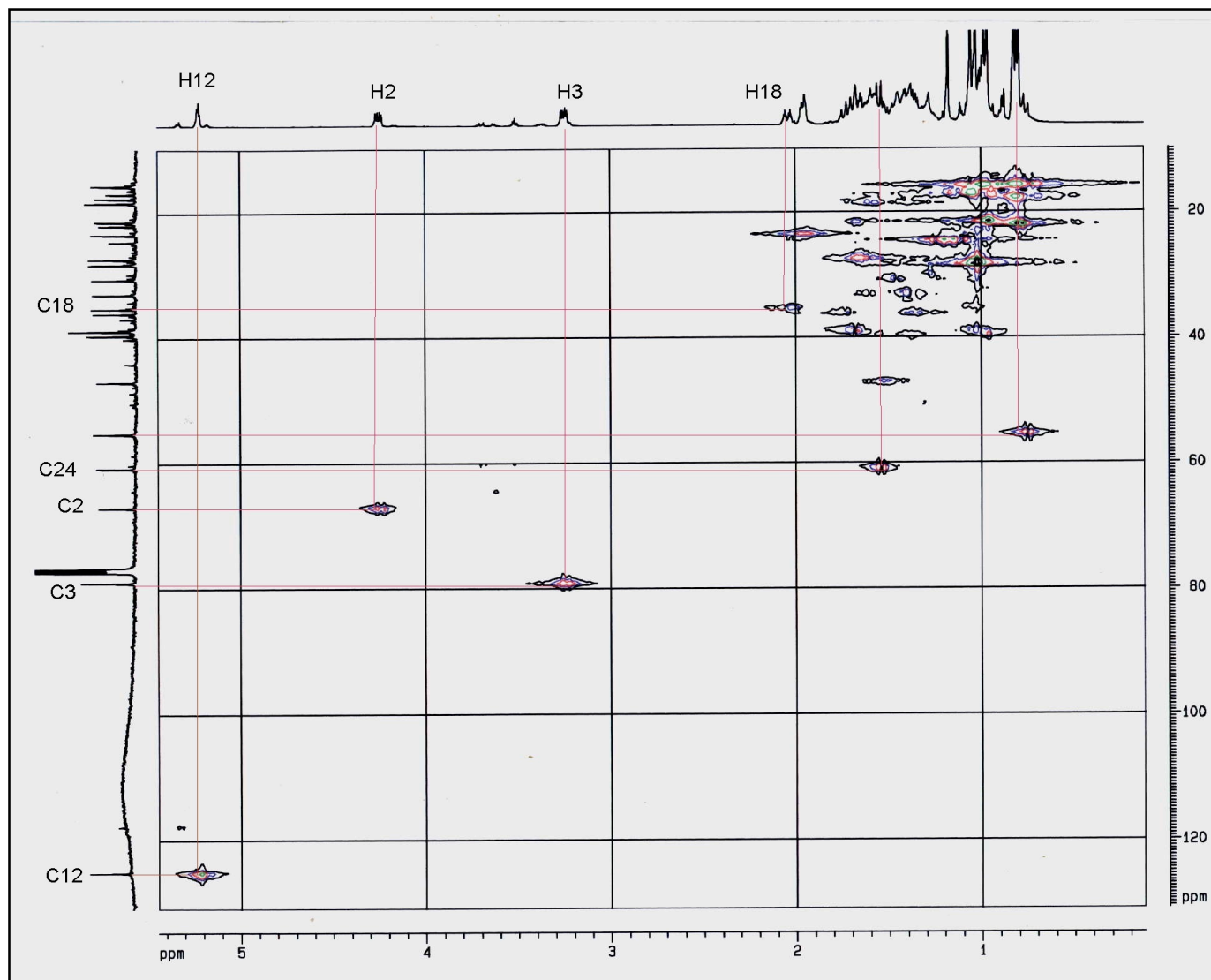


Figura 38: Espectro RMN - CH Cosy (HMQC) da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

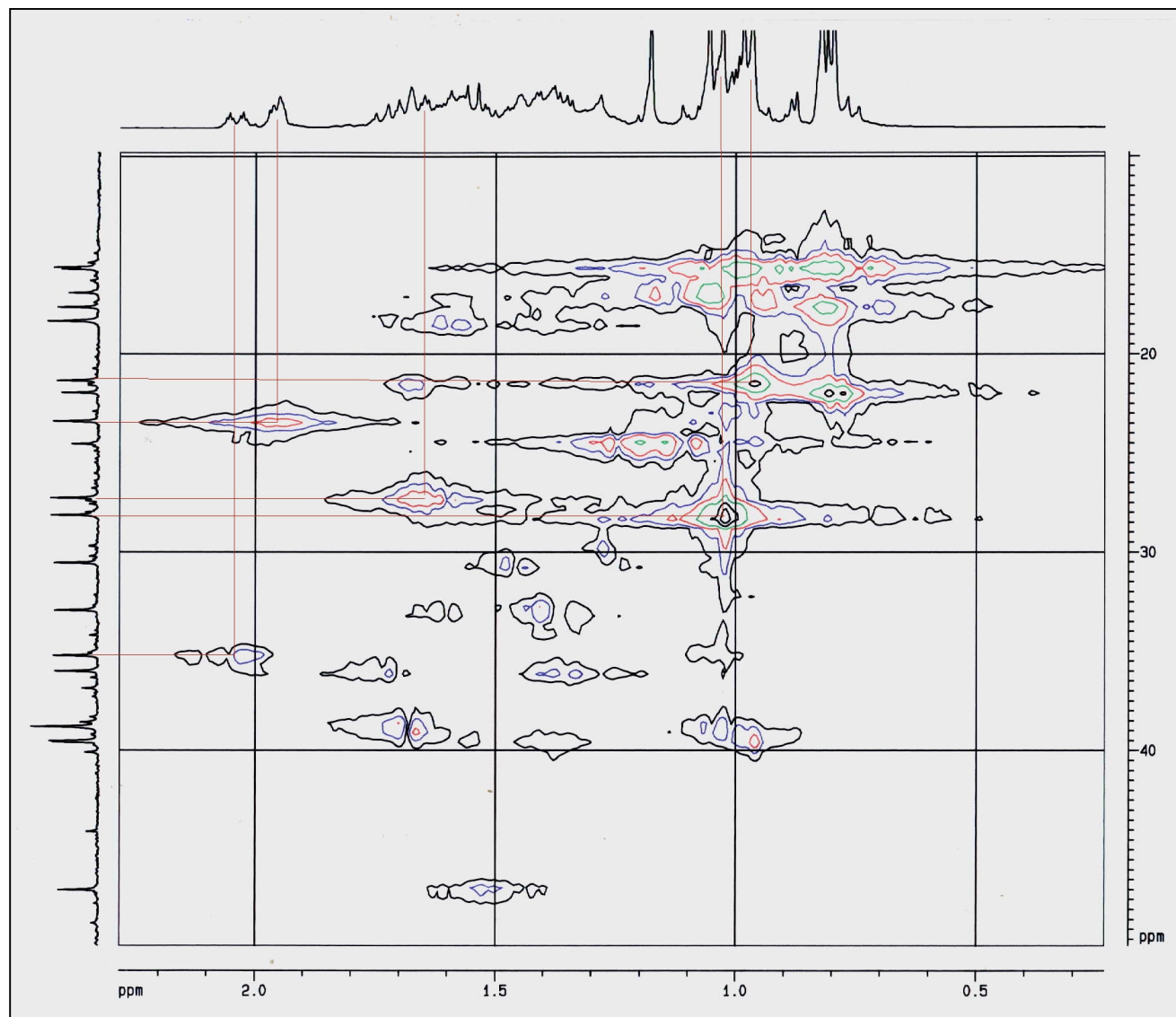
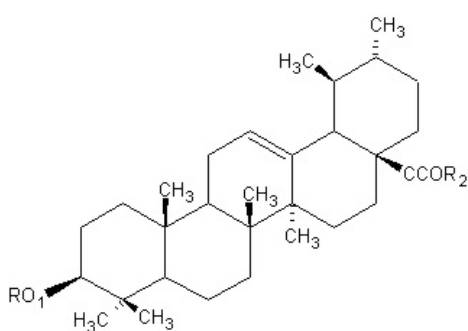


Figura 39: Espectro RMN - CH Cosy (HMQC) ampliado da substância BU3 a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

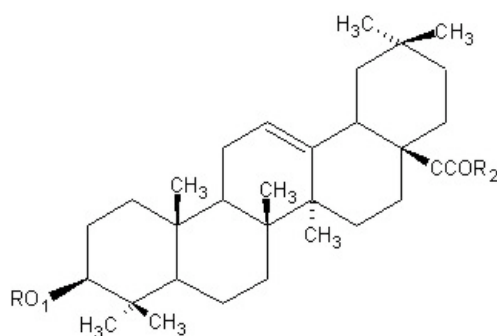
De acordo com as informações iniciais, sugere-se que a substância seja um derivado triterpênico pentacíclico do tipo  $\Delta^5$  ou  $\Delta^5$ -amirina (Figura 40). Para a confirmação da presença de um triterpeno foi realizada a reação de Libermann-Burchard (BRIESKORN; HOFMANN, 1964 apud SCHENKEL, 1980) utilizando o ácido ursólico e o  $\Delta^5$ -sitosterol para comparação. A coloração observada nessa reação permitiu diferenciar entre triterpenos e esteróides, tendo sido observado que a substância BU3 obteve coloração idêntica à reação com ácido ursólico.

Para distinguir a classe ( $\Delta^5$  ou  $\Delta^5$ -amirina - Figura 40) em que pertence a substância BU3, fez-se comparações com dados da literatura para os sinais de C-12 e C-13. Segundo Seo, Tomita e Tori (1975) os sinais de C-12 para substâncias com núcleo urs-12-eno ocorrem entre  $\delta_c$  124,3 a  $\delta_c$  125,5 e para as substâncias com núcleo olean-12-eno os sinais ocorrem entre  $\delta_c$  121,5 a  $\delta_c$  122,1. Os mesmos autores relatam que os sinais de C-13 para substâncias com núcleo urs-12-eno ocorrem entre  $\delta_c$  137,9 a  $\delta_c$  139,4 e para as substâncias com núcleo olean-12-eno os sinais ocorrem entre  $\delta_c$  143,4 a  $\delta_c$  145,0. No caso da substância BU3 os sinais observados em  $\delta_c$  125,2 e  $\delta_c$  138,0 sugerem tratar-se de um derivado de núcleo urs-12-eno ( $\Delta^5$  - amirina).





□-amirina (núcleo urseno)



□-amirina (núcleo oleanano)

Figura 40: Estruturas dos triterpenos do tipo □ e □ amirina.

No espectro de RMN- $^1\text{H}$  há a presença de dois multipletos (dubleto de dubleto) (Figura 36) que ocorrem na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,3 e  $\delta_{\text{H}}$  4,3, estes sinais em RMN  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Cosy ( Figura 38) correlacionam-se com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  79,0 e  $\delta_{\text{C}}$  67,1 respectivamente. Os autores Seo, Tomita e Tori (1975) relatam os seguintes deslocamentos químicos para  $\text{C}_{20}$  e  $\text{C}_{30}$  hidroxilados:  $\delta_{\text{C}}$  66,5 e  $\delta_{\text{C}}$  78,9. Concordando com esses autores, os pesquisadores Kojima e Ogura (1989) relatam que  $\text{C}_{20}$  e  $\text{C}_{30}$  hidroxilados ocorrem em  $\delta_{\text{C}}$  66,5  $\delta_{\text{H}}$  4,0 e 78,9  $\delta_{\text{H}}$  3,4 respectivamente. Com a finalidade de mostrar as diferenças estruturais entre a configuração □ e □, os autores Siddiqui, Sultana e Begum (2000) confirmam que  $\text{H}_{20}$  aparece na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,3 (ddd) e  $\text{H}_{30}$  apresenta-se na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,0. Diante de tais dados da literatura, sugere-se que a estrutura da substância BU3 seja dihidroxilada nas posições  $\text{C}_{20}$  e  $\text{C}_{30}$ , devido similaridade com os dados apresentados. No entanto, na hipótese de um núcleo urseno, esperar-se-ia para  $\text{H}_3$  um dubleto, o que não é observado.

No espectro de correlação RMN- $^{13}\text{C}$  -  $^1\text{H}$  na região de  $\delta_{\text{C}}$  60,8 há um sinal que correlaciona-se com o próton na região de  $\delta_{\text{H}}$  1,5, o que é difícil de explicar,

possivelmente esses sinais correspondem a impurezas. No espectro de RMN- $^1\text{H}$  na região entre  $\delta_{\text{H}}$  3,3-4,2 há sinais que também indicam a presença de impurezas.

Dessa forma, para elucidação mais exata da substância BU3 será necessário a obtenção de dados adicionais, especialmente espectro de massas para confirmar o tipo descrito. Os dados descritos sugerem tratar de um triterpeno dihidroxilado, possivelmente 2 $\beta$  3 $\beta$ .

A análise cromatográfica da substância BU3 é ilustrada na Figura 41.

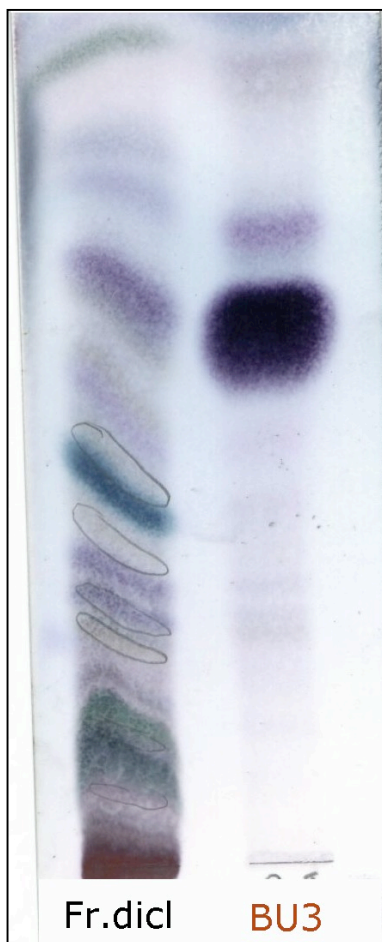


Figura 41: Análise cromatográfica da substância BU3

Fase móvel: diclorometano : metanol (97:3 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldefido sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: Fr.dicl.- Fração diclorometano

BU3 – Substância isolada

### 5.3.3 *Análise da substância BU2*

A substância BU2 foi obtida a partir da fração acetato de etila do extrato acetônico. Após sucessivos procedimentos cromatográficos, isolou-se a substância BU2, conforme ilustra Figura 17.

#### 5.3.3.1 *Análise do espectro Ultravioleta da substância BU2*

O espectro de flavonas e flavonóis exibe duas bandas intensas de absorção na região de 240-400 nm. As duas bandas são denominadas banda I (300-380 nm) e banda II (240-280 nm). A banda I está associada à absorção do anel B (sistema cinamoil) e a banda II associa-se a absorção do anel A (sistema benzoila). O espectro de metanol, particularmente a posição da banda I, fornece informações sobre o tipo de flavonóide e bem como o tipo de padrão de oxigenação, sendo que, para flavonas a banda I ocorre na região entre 304-350 nm e para os flavonóis a banda I ocorre entre 352-385 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Analisando o espectro em metanol da substância BU2 observa-se que a banda I encontra-se na região de 336,3 nm e a banda II na região de 272,1 nm, o que sugere que a substância BU2 trata-se de uma flavona (Figura 42).

O espectro com metóxido de sódio (NaOMe) detecta a presença de grupos hidroxilas livres na posição 3 ou 4'. Quando flavonas e flavonóis em presença de solução metanólica de NaOMe, produzem um efeito batocrômico da ordem de 40-65 nm na banda I sem diminuir a intensidade, trata-se da presença de grupo hidroxila em 4'. Flavonóis com ausência de 4'-OH, também apresentam efeito batocrômico de 50-60 nm, mas com diminuição da intensidade. Flavonóis com hidroxilas em ambas as posições 3 e 4' são instáveis em NaOMe e a banda de absorção degenera em poucos minutos (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). No caso da substância BU2, em presença da solução metanólica de NaOMe, houve um efeito batocrômico de 60

nm com aumento da intensidade na banda I, o que indica uma hidroxila livre na posição 4'. No espectro NaOMe após 5 minutos, constatou-se que não houve degeneração, corroborando com a proposição de que a substância BU2 trata-se de uma flavona com hidroxila livre em C-4(Figura 42).

O acetato de sódio (NaOAc) é uma base mais fraca que NaOMe, e sendo assim ioniza os grupos hidroxilas ácidos, isto é, nas posições 3,7 e 4'. A ionização da hidroxila de C-7 afeta principalmente a banda II, e a ionização em 3 ou 4' afeta principalmente a banda I. A solução NaOAc é particularmente útil para diagnosticar a presença de hidroxila na posição C-7. Assim sendo, flavonas e flavonóis em presença de solução de NaOAc, apresentam um efeito batocrômico de 5-20 nm na banda II. Quando há substituições oxigenadas nas posições de 6 e 8 em flavonas, o efeito batocrômico com NaOAc é geralmente pequeno ou imperceptível, isso devido à redução da acidez do grupo hidroxila em C-7. Caso o flavonóide apresentar mudança após vários minutos, significa que houve uma decomposição na presença de álcali. Na presença de NaOAc e ácido bórico, o ácido bórico irá quelar grupos ortodihidroxilados. Em flavonas e flavonóis contendo anel B ortohidroxilado, o espectro apresenta um efeito batocrômico de 12-30 nm na Banda I em presença de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (MABRY; MARKHAM; THOMAS,1970).

No caso da substância BU2, em presença de solução NaOAc, observa-se que na banda II há um desvio batocrômico de apenas 3 nm, o que indica a ausência de hidroxila livre na posição 7, ou ainda, no caso de hidroxila livre nesta posição, a presença concomitante de hidroxilas nos carbonos vizinhos. A ausência do efeito batocrômico de 12-30 nm na banda I em presença de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, sugere que não há grupos ortodihidroxilados no anel B.

Por outro lado, a adição de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) forma quelato tanto com grupos dihidroxilados quanto com a carbonila do  $\text{C}_4$  e hidroxilas em  $\text{C}_3$  e/ou  $\text{C}_5$ , sendo que os quelatos envolvendo a carbonila em  $\text{C}_4$  apresentam-se estáveis em presença de ácido (HCl). Dessa forma, os espectros de  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  são úteis para caracterizar a presença de grupos ortodihidroxilados no anel B e para identificar 5-OH e 3-OH. A presença de grupo ortodihidroxilado no anel B da flavona e flavonol pode ser detectada pela comparação do espectro na presença de  $\text{AlCl}_3$  com o obtido de  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ . O efeito hipsocrômico de 30-40 nm observado na banda I do espectro de  $\text{AlCl}_3$  após adição de ácido, resulta da decomposição do complexo de  $\text{AlCl}_3$  com grupos ortodihidroxilados. O espectro de  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  típico de uma flavona 5-OH consiste em quatro bandas principais de absorção, banda Ia, Ib, IIa e IIb, os quais apresentam desvio batocrômico em relação as suas bandas originais (I e II) do espectro metanólico. Isso acontece tanto para espectros de flavonóides com substituintes 3-OH como 3,5- dihidroxilados. Há uma clara distinção entre a magnitude do desvio batocrômico com  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  associada com 5-OH flavona (e flavonol contendo OH em 5 e 3) e aquela observada para flavonóides contendo 3-OH. O desvio batocrômico da banda I (em metanol) para a banda Ia ( $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ ) no espectro de flavona com 5-OH e flavonol 3-OH é da ordem de 35-55 nm. Em contraste, o desvio em torno de 60 nm é para flavonóis (MABRY; MARKHAM; THOMAS,1970).

No caso da substância BU2 a comparação do espectro de  $\text{AlCl}_3$  com  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  indica que a substância BU2 não possui no anel B grupamento ortodihidroxilado e, ainda, através da comparação com o espectro em metanol, indica uma hidroxila na posição 5 (Figura 42).

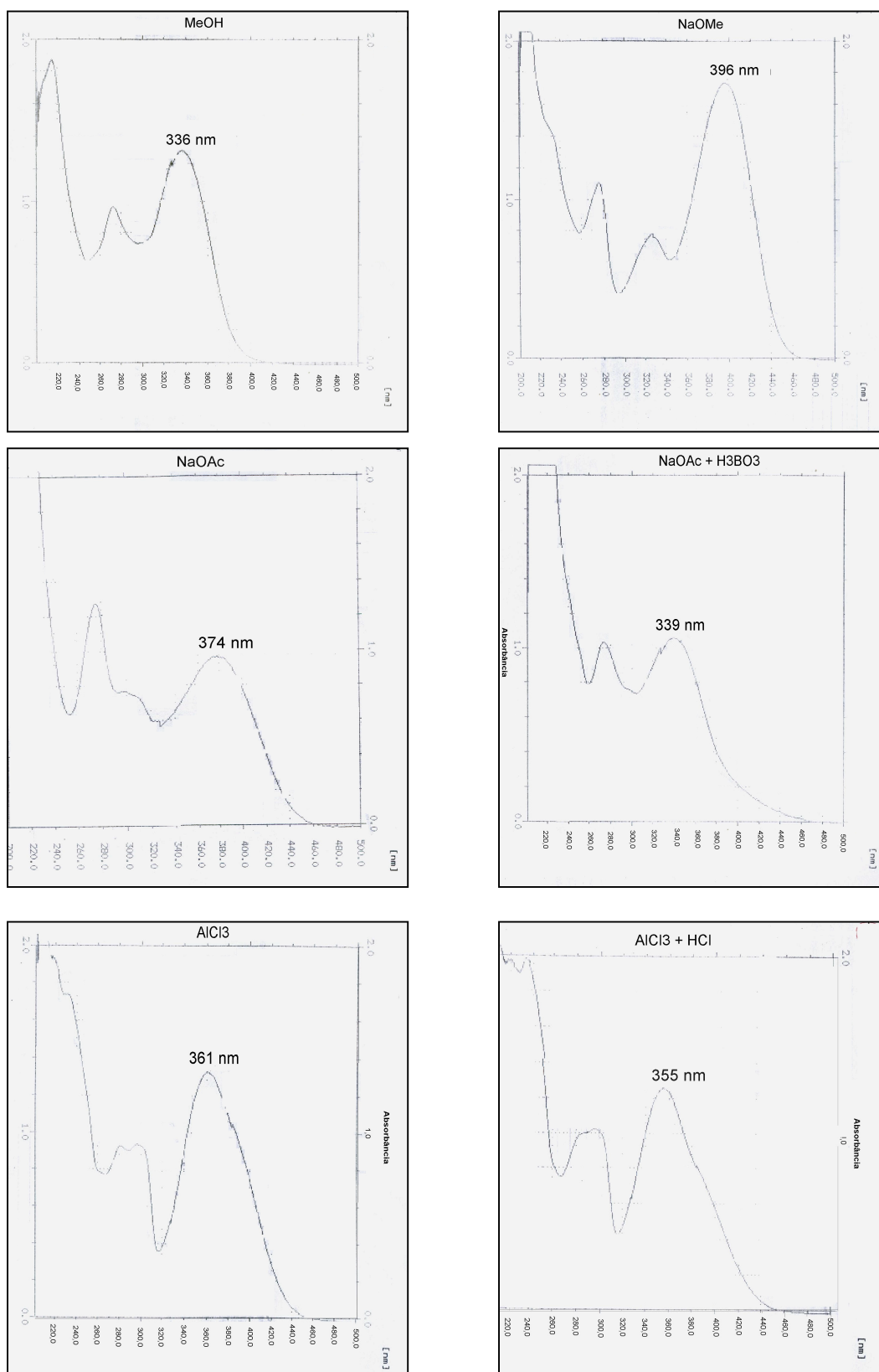


Figura 42 : Espectros de ultravioleta da substância BU2.

### 5.3.3.2 *Análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear da substância BU2*

Analisando o espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 46) e (Figura 47) da substância BU2, pode-se verificar a presença de dois dubletos que ocorrem na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,9 e  $\delta_{\text{H}}$  7,9. Segundo Mabry; Markham; Thomas (1970) e Harborne; Mabry; Mabry (1975) os prótons dos anéis B ocorrem na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,7-  $\delta_{\text{H}}$  7,9. Se o anel é oxigenado na posição 4', um típico padrão de dois dubletos é observado. O dubleto para os prótons 3' e 5' ocorrem em campo mais alto que o dubleto dos prótons 2' e 6', e aparecem em cerca de  $\delta_{\text{H}}$  6,7 -  $\delta_{\text{H}}$  7,1 ppm para todos os tipos de flavonóides. Sendo assim, os dois dubletos mencionados,  $\delta_{\text{H}}$  6,9 e  $\delta_{\text{H}}$  7,9, correspondem aos prótons H3'/H5' e H2'/H6' respectivamente. No espectro de correlação C-H Cosy (HMQC) (Figura 49), os dubletos H3'/H5' ( $\delta_{\text{H}}$  6,9 ) e H2'/H6' ( $\delta_{\text{H}}$  7,9) correlacionam com os seguintes sinais de  $^{13}\text{C}$   $\delta_{\text{C}}$  115,6 e  $\delta_{\text{C}}$  128,0, respectivamente. Corroborando com essa sugestão, os autores HAIDER et al. (1988) apresentam as seguintes atribuições:  $\delta_{\text{C}}$  128,5 (H2'/H6' – d) e  $\delta_{\text{C}}$  116,0 (H3'/H5' – d).

Na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,6 há a presença de dois singletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  6,59 e o outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,62. No espectro de correlação C-H Cosy (HMQC) (Figura 49) esses sinais correlacionam com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  93,9 e  $\delta_{\text{C}}$  102,0, respectivamente, que podem ser atribuídos aos carbonos C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  93,9) e C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  102,0). HAIDER et al. (1988) relatam valores semelhantes para esses carbonos, conforme Tabela 12.

Na região entre  $\delta_{\text{H}}$  4,0 e  $\delta_{\text{H}}$  5,0 , há a presença de dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,9 e  $\delta_{\text{H}}$  4,8, que devem ser interpretados como duas metoxilas. No espectro de correlação C-H Cosy (HMQC), essas metoxilas correlacionam com os carbonos:  $\delta_{\text{C}}$  59,3 e  $\delta_{\text{C}}$  55,3, respectivamente. Sugere-se que essas metoxilas estão localizadas nas posições C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub>. (Figura 49), visto a ausência de sinais para hidrogênios

nesses carbonos e de acordo com os deslocamentos observados nos espectros UV com acetato de sódio/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

No espectro de correlação H-H Cosy, pode-se verificar a correlação  $\delta_{\text{H}}$  3,9 com o  $\delta_{\text{H}}$  6,62 (Figura 50), que corresponde ao hidrogênio em C-8.

Os dados apresentados indicam que a substância BU2 é o flavonóide cirsimaritina, ilustrado na Figura 45, o que está de acordo com os dados de ultravioleta e NMR descritos na literatura (BORDIGNON; MONTANHA; SCHENKEL, 2003). A comparação com amostra autêntica<sup>b</sup> (isolada de *Cunila angustifolia* e *Cunila incana*) em diferentes sistemas cromatográficos permitiu confirmar a identificação (Figura 44). Na literatura também há relato da presença de cirsimaritina nas espécies de *B. articulata* (GIANELLO; GIORDANO, 1984) e *B. trimera* (NAKASUGI; KOMAI, 1998).

---

<sup>b</sup> Amostra cedida pelo Dr. Sérgio Augusto de Loretto Bordignon, obtida de espécies de *Cunila* (BORDIGNON; MONTANHA; SCHENKEL, 2003)



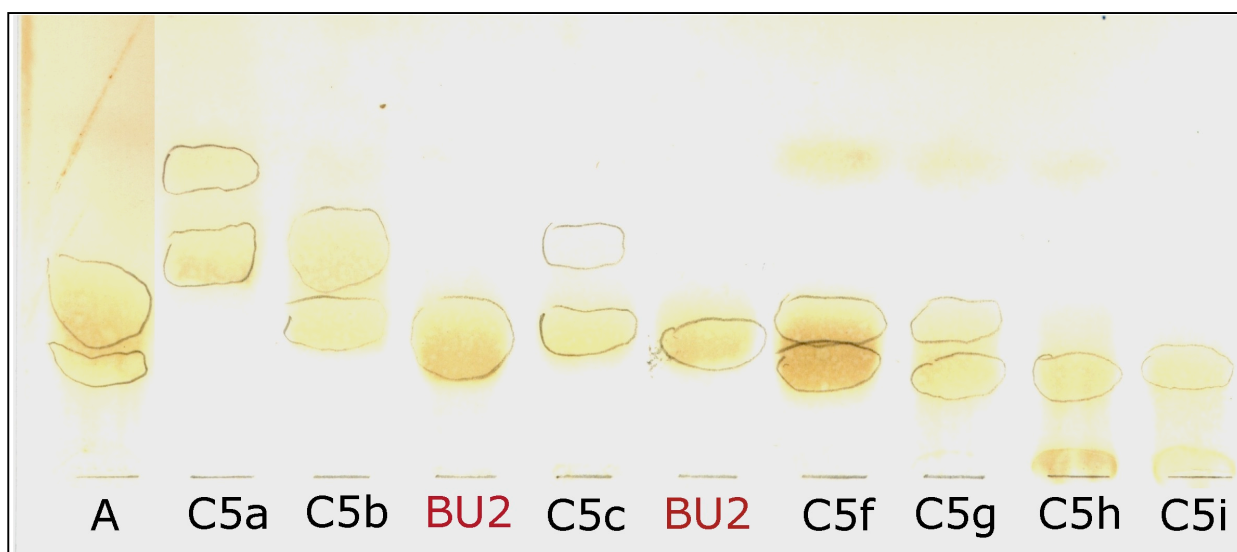


Figura 43: Análise cromatográfica do isolamento da substância BU2.

Fase móvel: diclorometano : acetona (28:2 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: A – amostra (subfração FP6)

C5a, C5b, C5c, C5f, C5g, C5h, C5i – Frações  
obtidas da coluna 4

BU2 – Substância isolada

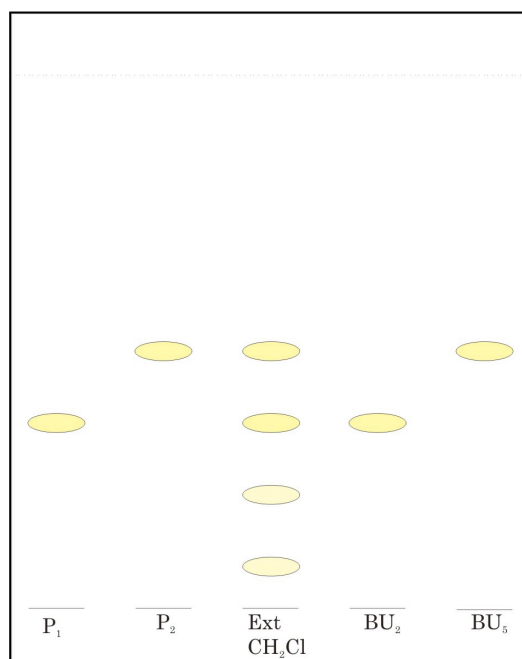


Figura 44: Esquema representativo de cromatografia em camada delgada das substâncias BU2 e BU5 frente a substâncias autênticas, cirsimarina e xantomicrool.

Fase móvel: diclorometano : éter de petróleo : metanol (40:40:3 v/v)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: P1 – Cirsimarina

P2 – Xantomicrool

BU2 – Substância isolada

BU5 – Substância isolada

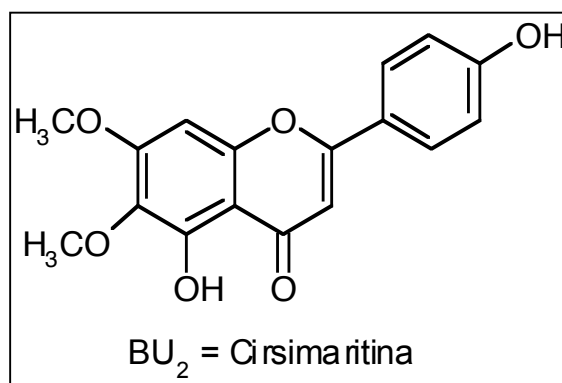


Figura 45: Estrutura da substância BU2 – Cirsimarina.

A Tabela 12 compara os valores obtidos para a substância BU2 com valores atribuídos na literatura.

Tabela 12: Valores de  $^{13}\text{C}$  atribuídos a substância BU2 comparados com os valores atribuídos na literatura.

Número de Carbono	Valores atribuídos para BU2	HAIDER et al. (1988) <sup>a)</sup>
2	165,0	164,1
3	102,0	102,7
4	182,9	182,2
5	152,6	152,6
6	131,5	132,0
7	157,4	158,6
8	93,9	91,6
9	153,3	152,1
10	102,8	105,1
1'	120,3	121,2
2'/6'	128,0	128,5
3'/5'	115,6	116,0
4'	182,8	161,3
6-OCH <sub>3</sub>	59,5	60,0 (q)
7-OCH <sub>3</sub>	55,3	56,4 (q)

a) RMN -  $^{13}\text{C}$  a 25 MHz (DMSO - d<sub>6</sub>).

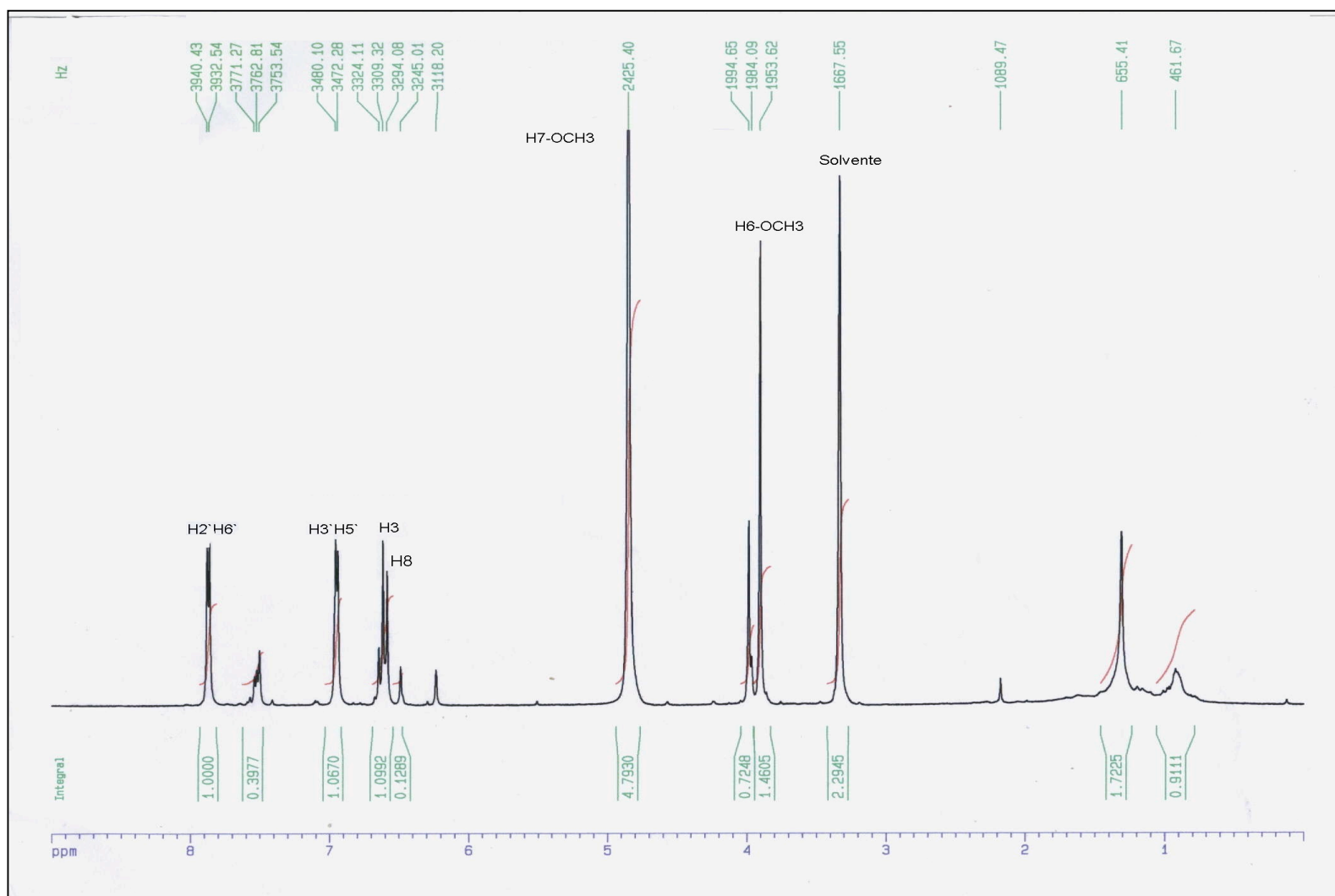


Figura 46: Espectro RMN- $^1\text{H}$  da substância BU2 a 500 MHz (MeOD).

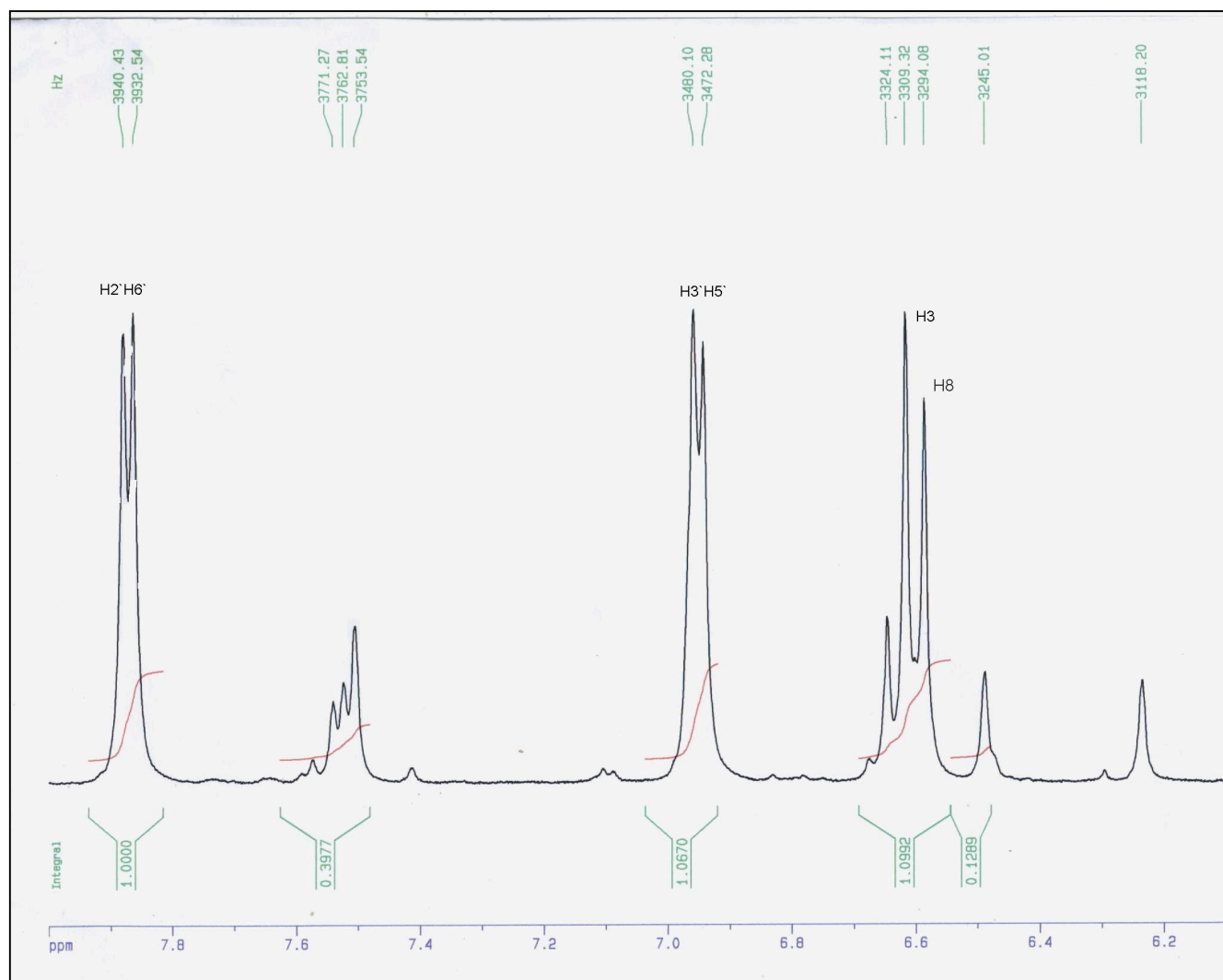


Figura 47: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da substância BU2 – ampliado – a 500 MHz (MeOD).

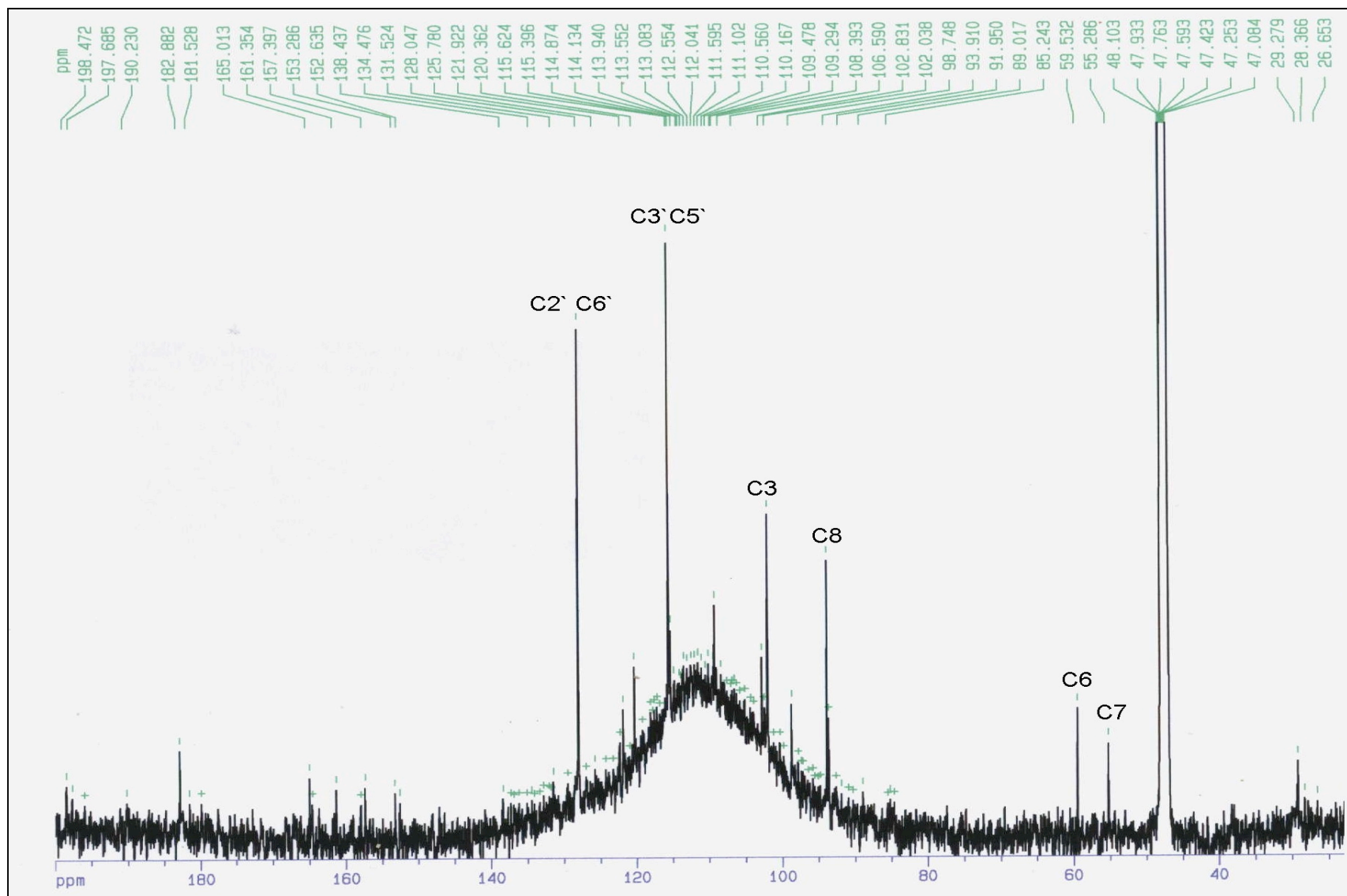


Figura 48: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  desacoplado da substância BU2 a 500 MHz (MeOD).

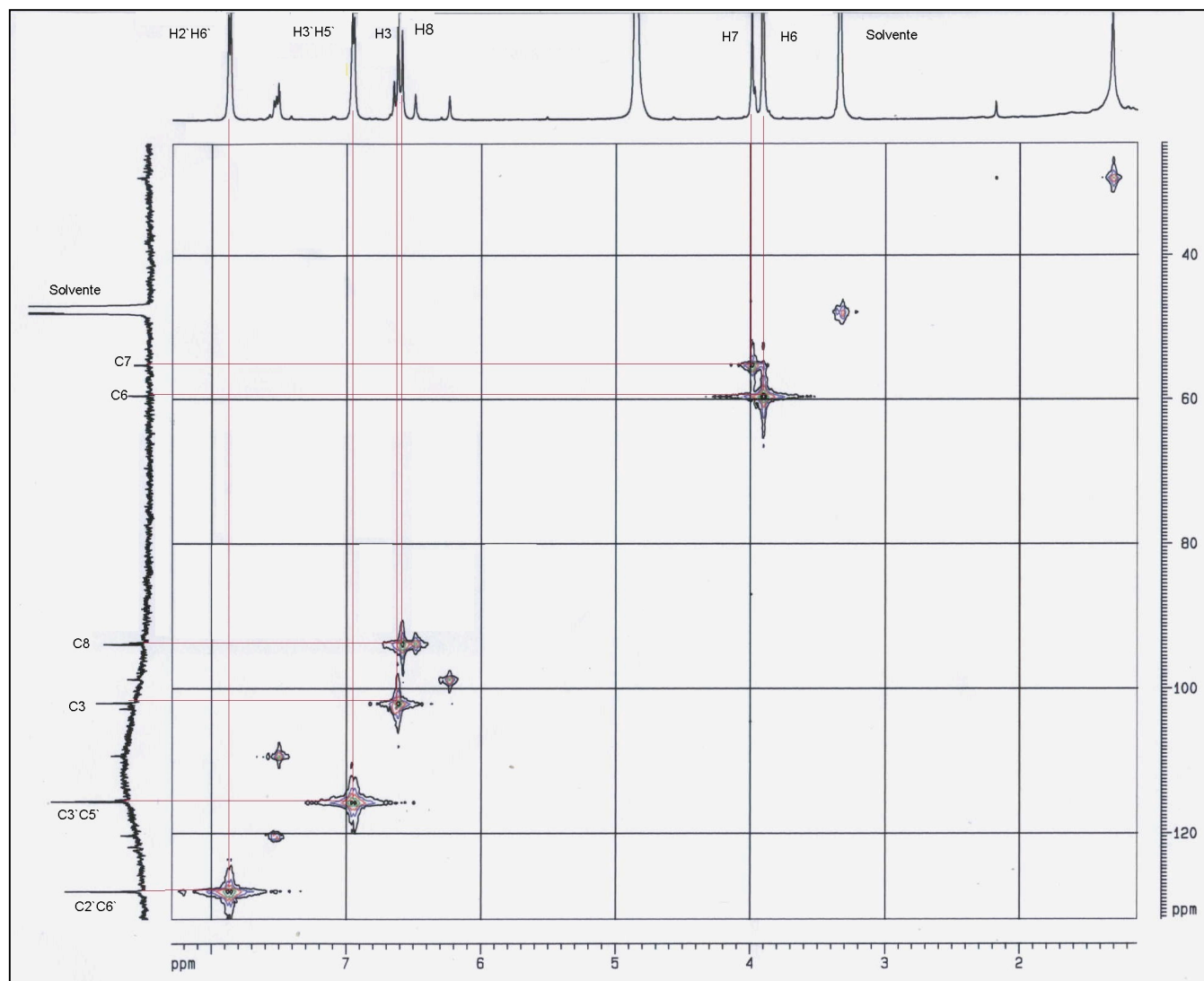


Figura 49: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Cosy da substância BU2 a 500 MHz (MeOD).

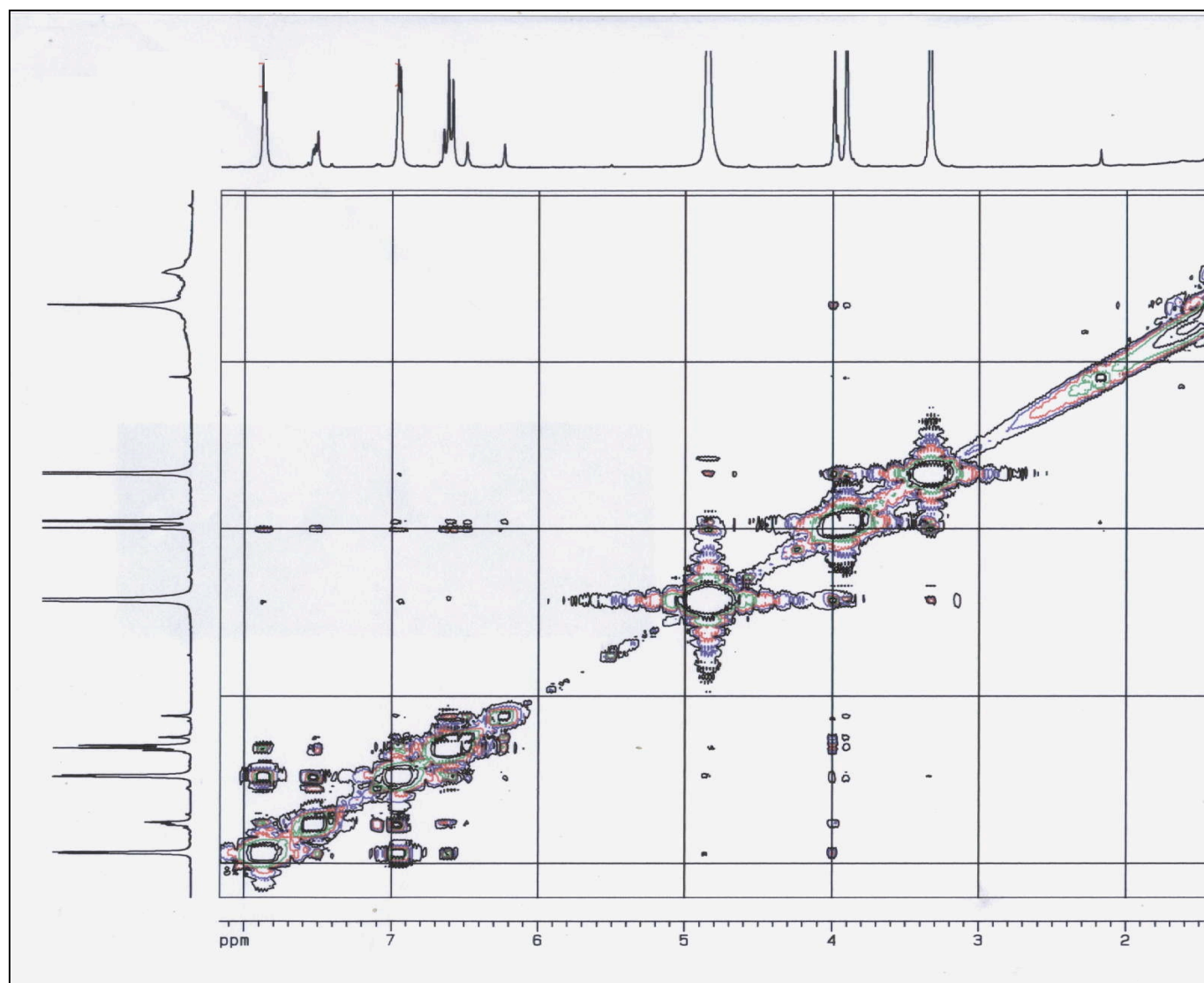


Figura 50: Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Cosy da substância BU2 a 500 MHz (MeOD).



#### 5.3.4 *Análise da substância BU4*

A substância BU4 foi obtida da fração diclorometano após sucessivas colunas cromatográficas, conforme demonstra a Figura 19.

##### 5.3.4.1 *Análise do espectro ultravioleta da substância BU4*

Analizando o espectro em metanol da substância BU4 (Figura 52) observa-se que a banda I encontra-se na região de 344,7 nm e a banda II na região de 274,2 nm. Sendo assim, sugere-se que a substância BU4 trata-se de uma flavona.

Interpretando o espectro de NaOMe da substância BU4 (Figura 52), observa-se que em presença da solução metanólica de NaOMe, houve um efeito batocrômico de 62 nm com aumento da intensidade na banda I, o que indica a presença de uma OH na posição 4'.

Examinando o espectro de NaOAc da substância BU4 (Figura 52), observa-se que na banda II há um desvio batocrômico de apenas 1,9 nm, o que indica a ausência de hidroxila livre na posição 7, ou ainda, no caso de hidroxila livre nesta posição, a presença concomitante de hidroxilas nos carbonos vizinhos. A ausência de efeito batocrômico de 12-30 nm na banda I em presença de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> sugere que não há grupos ortodihidroxilados no anel B.

A comparação dos espectros AlCl<sub>3</sub> e AlCl<sub>3</sub>/HCl (Figura 52) também indica que a substância BU5 não possui no anel B grupamento ortodihidroxilado e, ainda, através da comparação com o espectro em metanol, indica uma hidroxila na posição 5. O efeito batocrômico observado na banda I é da ordem de 26 nm para o espectro de AlCl<sub>3</sub> e para o espectro de AlCl<sub>3</sub>/HCl é da ordem de 19 nm.

Os dados apresentados sugerem que essa substância tenha estrutura similar as outras flavonas. A posição da banda II, em 274,2, portanto em

comprimento de onda próximo aquele observado no caso da cirsimarina (272,1 nm) sugere um padrão de oxigenação similar a cirsimarina, possivelmente diferindo desta pela presença de uma das hidroxilas, em C-6 ou C-7 livre. Para essa substância não foi possível a realização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, bem como a comparação com substâncias autêntica, para a elucidação da substância BU4 são necessárias análises espectroscópicas adicionais.

O perfil cromatográfico é apresentado na Figura 51 onde pode-se observar a distinção entre a BU4 e BU2 de acordo com a proximidade dos valores dos R<sub>f</sub>s.

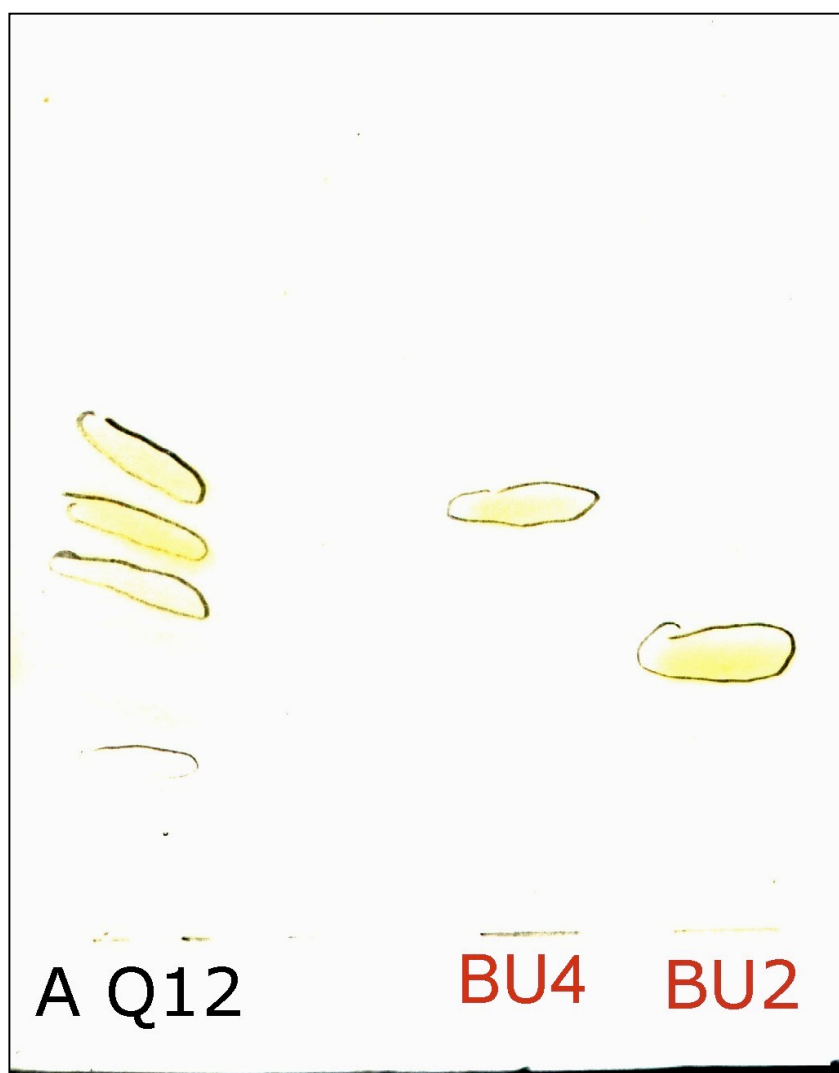


Figura 51: Análise cromatográfica da substância BU4.

Fase móvel: diclorometano : metanol (98:2 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: AQ12 – Amostra subfração Q12

BU4 – Substância isolada

BU2 – Substância isolada (comparação)

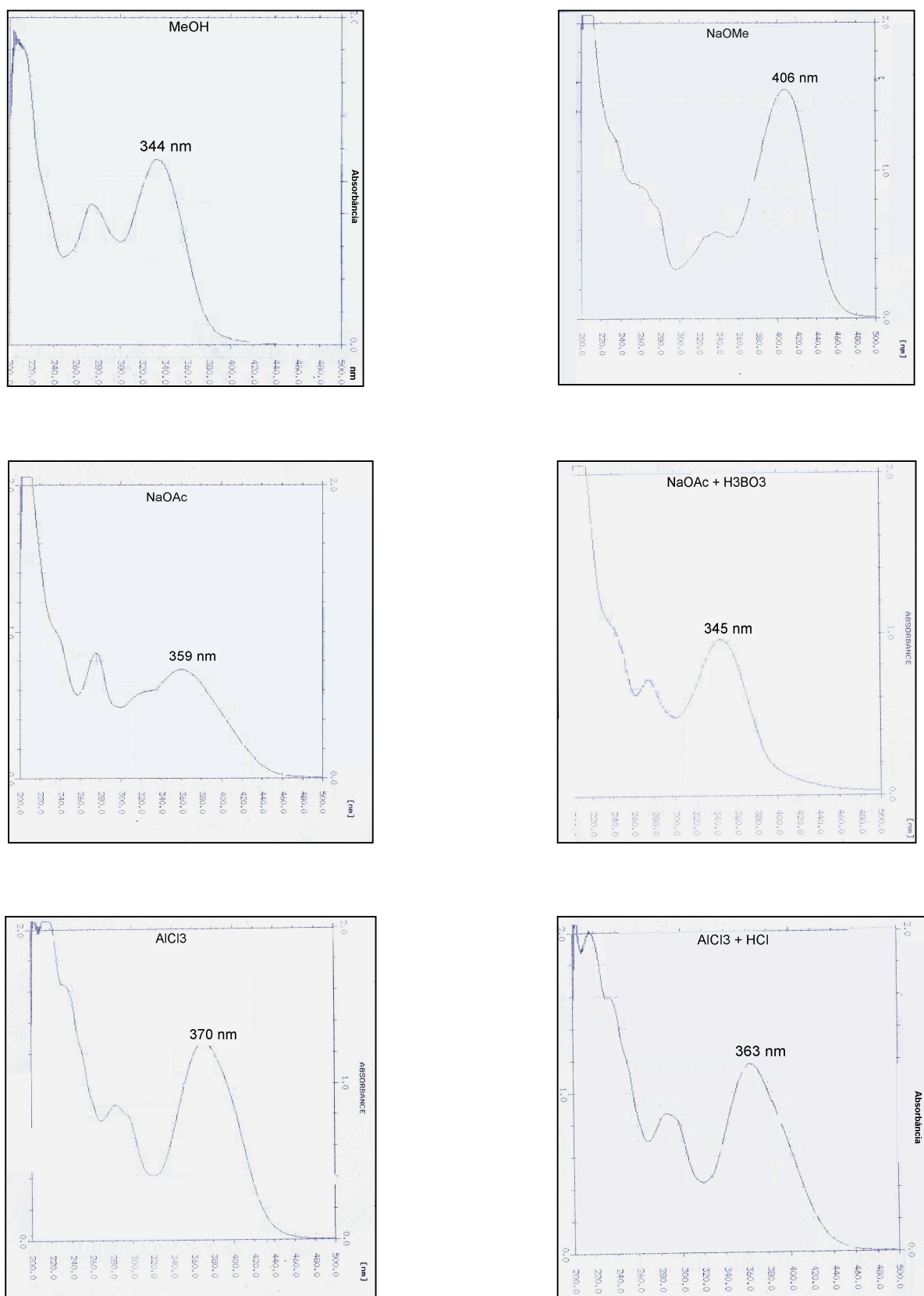


Figura 52: Espectros de ultravioleta da substância BU4.

### 5.3.5 *Análise da substância BU5*

A substância BU5 foi isolada a partir da fração diclorometano após sucessivas colunas cromatográficas, conforme ilustra Figura 20.

#### 5.3.5.1 *Análise do espectro de ultravioleta da substância BU5*

Analizando o espectro em metanol (Figura 55) da substância BU5 observa-se que a banda I encontra-se na região de 333,8 nm e a banda II na região de 274,3 nm, o que sugere tratar-se de uma flavona. Interpretando o espectro de NaOMe da substância BU5, observa-se que em presença da solução metanólica de NaOMe, houve um efeito batocrômico de 49,7 nm com aumento da intensidade na banda I, o que indica a presença de hidroxila livre na posição 4'.

Examinando o espectro de NaOAc (Figura 55) da substância BU5, observa-se que na banda II há um desvio batocrômico de apenas 1 nm, o que indica a ausência de hidroxila livre na posição 7, ou ainda, no caso de hidroxila livre nesta posição, a presença concomitante de hidroxilas nos carbonos vizinhos. A ausência de efeito batocrômico de 12-30 nm na banda I em presença de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> sugere que não há grupos ortodihidroxisilados no anel B.

A comparação dos espectros AlCl<sub>3</sub> e AlCl<sub>3</sub>/HCl também indica que a substância BU5 não possui no anel B grupamento ortodihidroxisilado e, ainda, através da comparação com o espectro em metanol, indica uma hidroxila na posição 5. O efeito batocrômico observado na banda I é da ordem de 25,3 nm para o espectro de AlCl<sub>3</sub> e para o espectro de AlCl<sub>3</sub>/HCl é da ordem de 22 nm.

De acordo com os dados apresentados sugere-se a hipótese de ser a estrutura ilustrada (Figura 53), substância semelhante à BU2 e BU4. A comparação cromatográfica (Figura 44) com amostras autênticas de flavonas (BORDIGNON;

MONTANHA; SCHENKEL, 2003 ) sugere tratar-se do xantomicrol. Para confirmação da identidade, análises adicionais são necessárias.

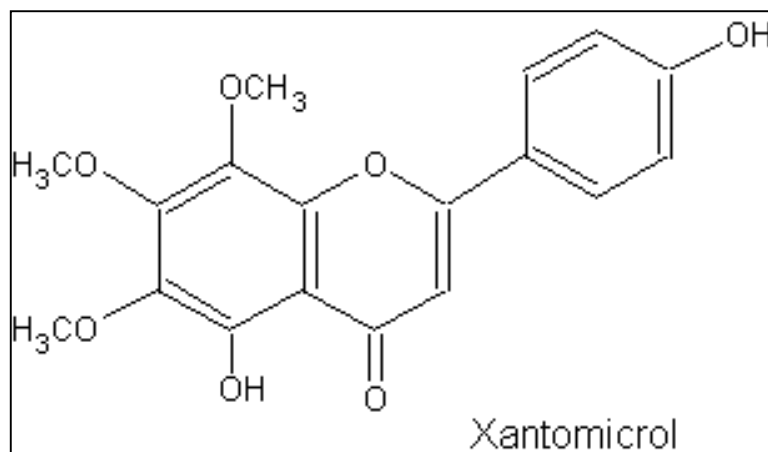


Figura 53: Estrutura da substância BU5 - xantomicrol.

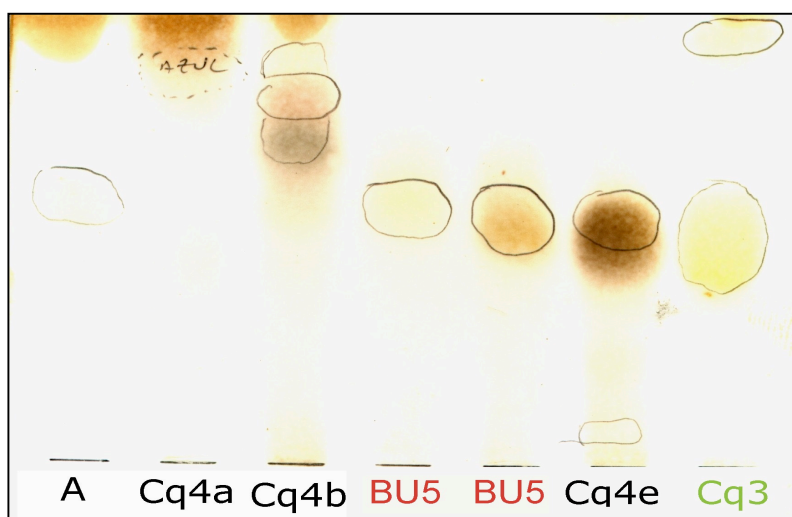


Figura 54: Análise cromatográfica do isolamento da substância BU5.

Fase móvel: éter de petróleo : acetato de etila (2:1 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: A– Amostra subfração CQ4+CQ5

Cq4a, Cq4b, Cq46 – Subfrações

BU5 – Substância isolada (comparação)

Cq3 – Subfração obtida após CQ2 (BU4)

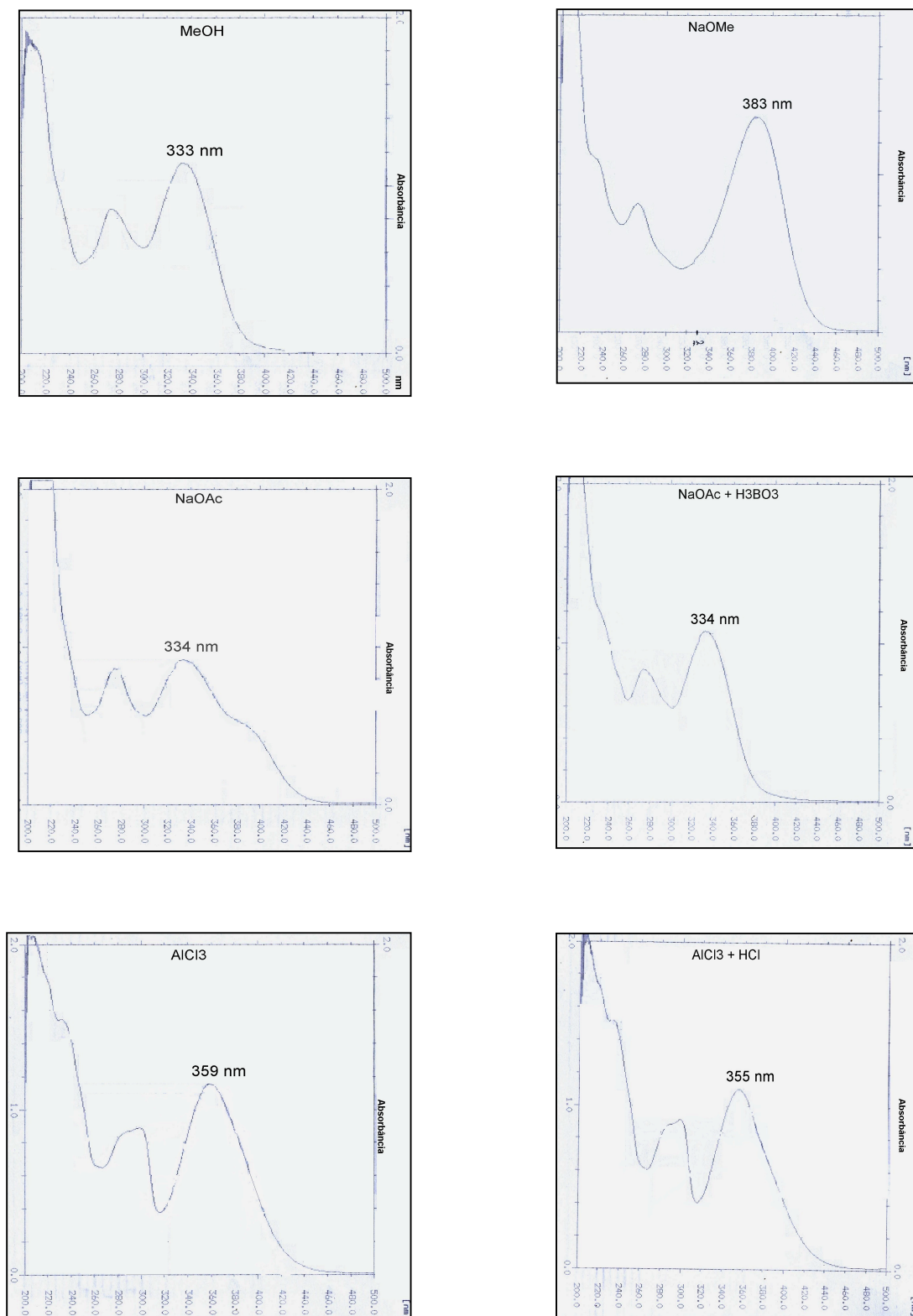


Figura 55: Espectro de ultravioleta da substância BU5.

### 5.3.5.2 *Análise de espectroscopia de RMN - $^{13}\text{C}$ da cera epicuticular.*

Comparando os valores de deslocamentos obtidos no espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  da cera epicuticular (Figura 56) com os dados de RMN -  $^{13}\text{C}$  para o ácido ursólico apresentados na literatura (Tabela 13); pode-se observar a presença de dois sinais que caracterizam a presença dessa substância na cera.

Tabela 13: Deslocamentos químicos dos principais carbonos do ácido ursólico.

Tipo de Carbono	RMN $^{13}\text{C}$ – cera epicuticular (ppm)	Autor: LEITE et al., 2001 (ppm)	Autor: TAKETA, 1997 (ppm)
C 12	125,228	124,6	125,2
C 13	138,403	138,2	138,3
C 18	53,770	52,4	52,7
C 19	38,692	38,5	39,1
C 20	38,495	38,4	38,8
C 28	172,451	178,2	179,9

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 56) da cera epicuticular apresenta os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  116,0 e  $\delta_{\text{C}}$  128,2, que são característicos dos carbonos C3'/C5' e C2'/C6' dos flavonóides. Como dito anteriormente, os prótons dos anéis B ocorrem na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,7-  $\delta_{\text{H}}$  7,9. No espectro de RMN -  $^1\text{H}$  (Figura 57) da cera na região entre  $\delta_{\text{H}}$  7,0 e 8,0 há a presença de um dubleto que pode-se caracterizar como sendo dos prótons H2'/H6' e ocorre dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,2 que pode-se dizer que caracteriza os H-8 e H-3, similar ao espectro da substância BU2 (Figura 46).

No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 56) da cera epicuticular observa-se sinal em  $\delta_{\text{C}}$  79,1 que é um valor semelhante ao sinal que aparece para a substância BU3 que sinalizou uma hidroxila em C-3, também há um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  66,1 que pode-se



dizer que caracteriza a hidroxila no C-2, como visto na substância BU3, ambas as hidroxilas na posição  $\alpha$ .

Na região de  $\delta_C$  10-30 há sinais que caracterizam as metilas e metilenos dos núcleos das substâncias BU1 e BU3. No espectro de RMN-  $^1H$  (Figura 57) na região de  $\delta_H$  1-1,5 há a presença da região conhecida como envelope, onde há grupos metilenos envolvidos, isso ocorre em hidrocarbonetos, uma evidência de que há hidrocarbonetos presente na cera epicuticular de *B. uncinella* conforme descritos para cera epicuticular de outras espécies Tabela 2.

Diante de tais evidências, pode-se afirmar que na cera epicuticular de *B. uncinella* predomina substâncias com núcleo urseno, flavonóides e hidrocarbonetos.

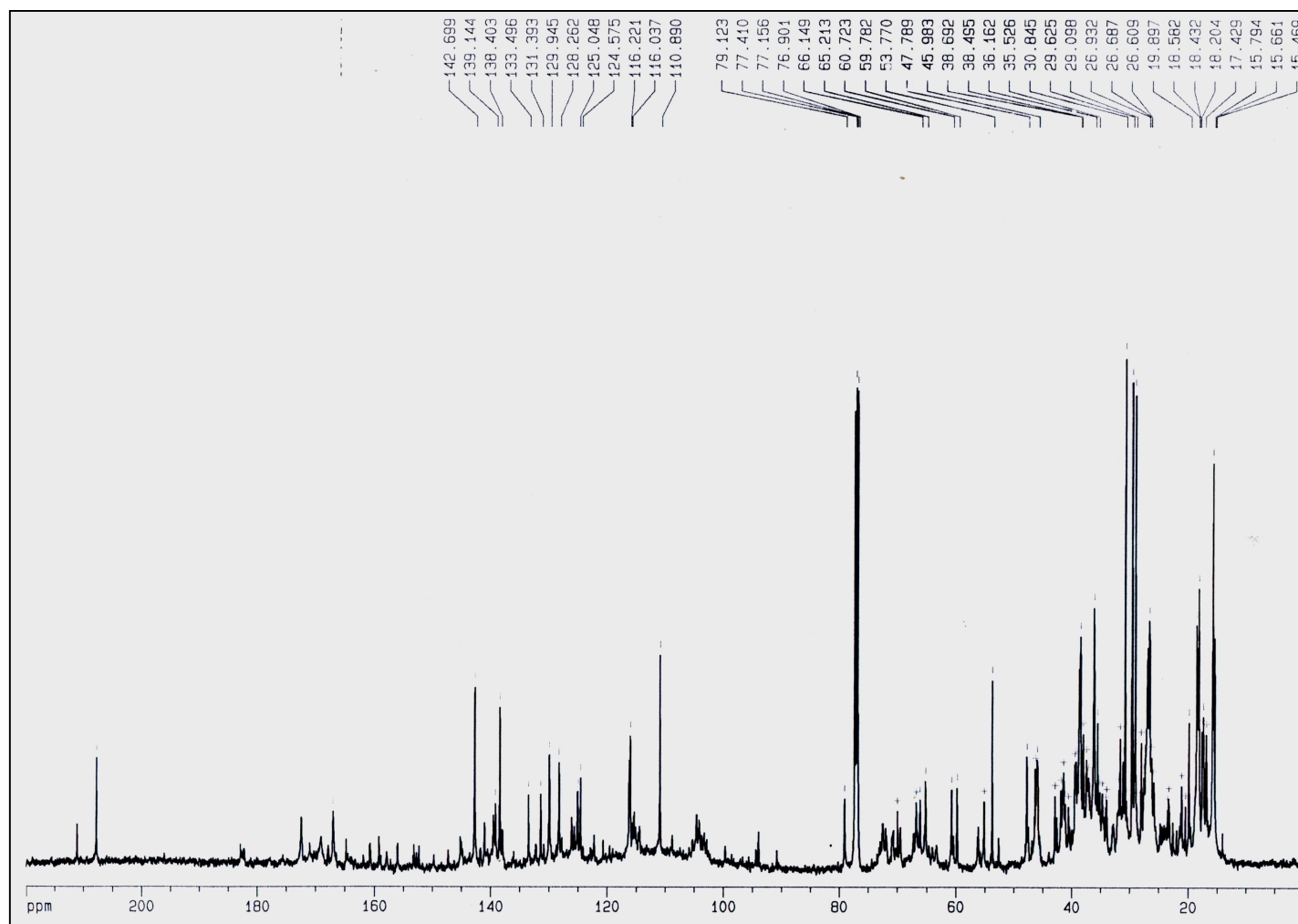


Figura 56: Espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

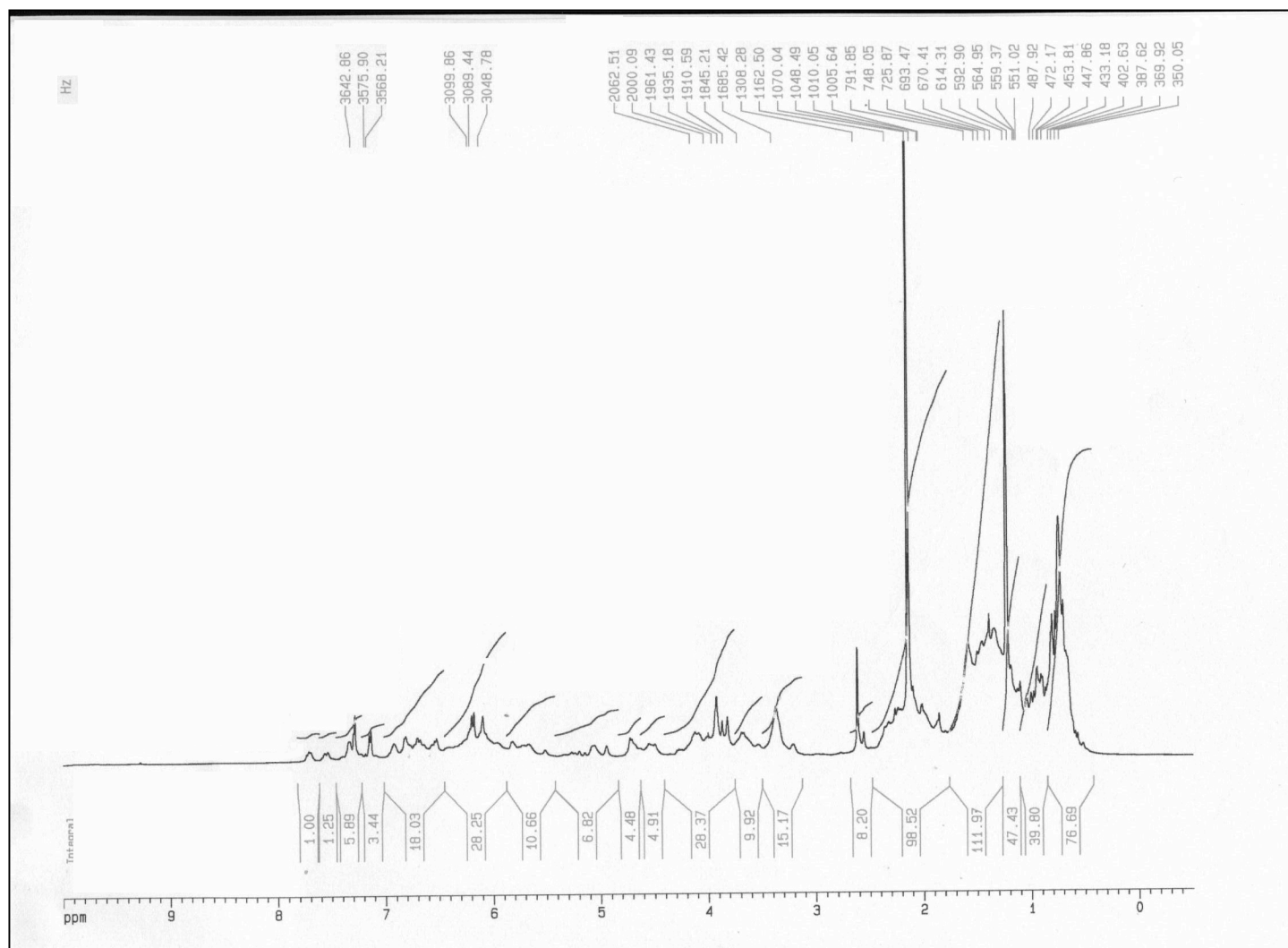


Figura 57: Espectro RMN- $^1\text{H}$  da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ).

#### **5.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos acetônicos de *B. uncinella*, *B. spicata*, *B. usterii*, *B. microcephala*, *B. trimera* e *B. articulata***

##### **5.4.1 Análise da atividade antioxidante dos extratos acetônicos frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina)**

Na Figura 59 estão representados os gráficos com dados relacionados a reatividade dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis*, frente ao radical DPPH. As concentrações, de cada espécie, estão apresentadas nos respectivos gráficos. Observa-se que a concentração de DPPH diminui a medida em que se aumenta a concentração dos extratos. De acordo com as IC<sub>50</sub> apresentadas (Tabela 14), observa-se que há espécies que apresentam maior poder sequestrante que outras. Os extratos das espécies *B. trimera* e *B. microcephala* com IC<sub>50</sub> 26,5 µg/mL e 32 µg/mL respectivamente, foram os que apresentaram maior capacidade em seqüestrar o radical DPPH enquanto que o extrato da espécie *B. articulata* (IC<sub>50</sub> = 550 µg/mL) comparada com as demais espécies, foi o que apresentou poder menor em seqüestrar o radical DPPH. Os extratos das espécies *B. usterii*, *B. uncinella* e *B. spicata* com as respectivas IC<sub>50</sub> 253 µg/mL, 280 µg/mL e 306 µg/mL comparadas as demais espécies, ficaram em um limiar intermediário de inibição do radical DPPH.

Na Figura 58 está representado os dados relacionados com a reatividade do flavonóide quercetina frente ao radical DPPH. Observa-se que a absorção do DPPH diminui conforme aumenta a concentração de quercetina. A quercetina apresentou uma IC<sub>50</sub> 13,8 µM (= 4,7 x 10<sup>3</sup> µg/mL), significando que os extratos das espécies de *B. trimera* e *B. microcephala* apresentam potencial comparável a quercetina cujo potencial já é bem conhecido (SAIJA et al., 1995; ACKER et al., 1996; GROOT, RAUEN, 1998; NAKAGAWA et al., 2000; DOK-GO et al., 2003).

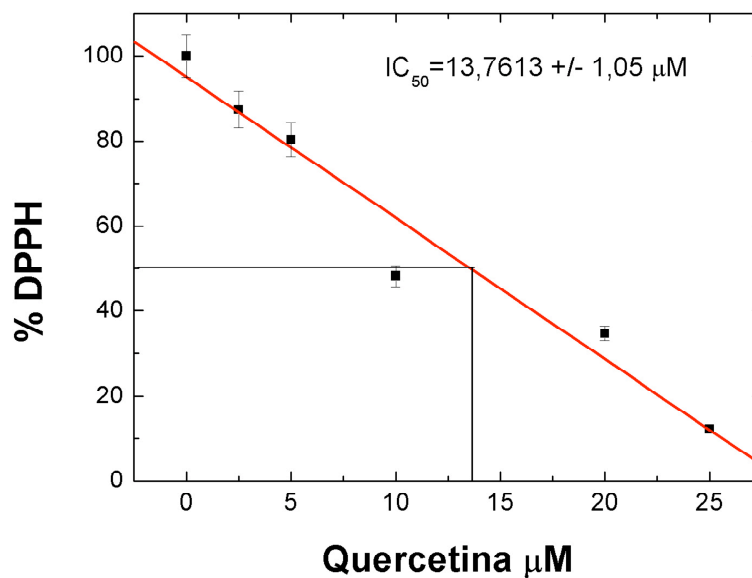


Figura 58: Efeito da quercetina frente ao radical livre DPPH. O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100%) e na presença de quercetina nas concentrações indicadas na figura. A análise espectrofotométrica foi realizada em 517nm.

Tabela 14: Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos acetônicos das diferentes espécies de *Baccharis* no ensaio de DPPH.

Extratos	IC <sub>50</sub> DPPH (μg/mL)
<i>B. articulata</i>	550,0
<i>B. microcephala</i>	32,0
<i>B. spicata</i>	306,0
<i>B. trimera</i>	26,5
<i>B. uncinella</i>	280,0
<i>B. usterii</i>	253,7

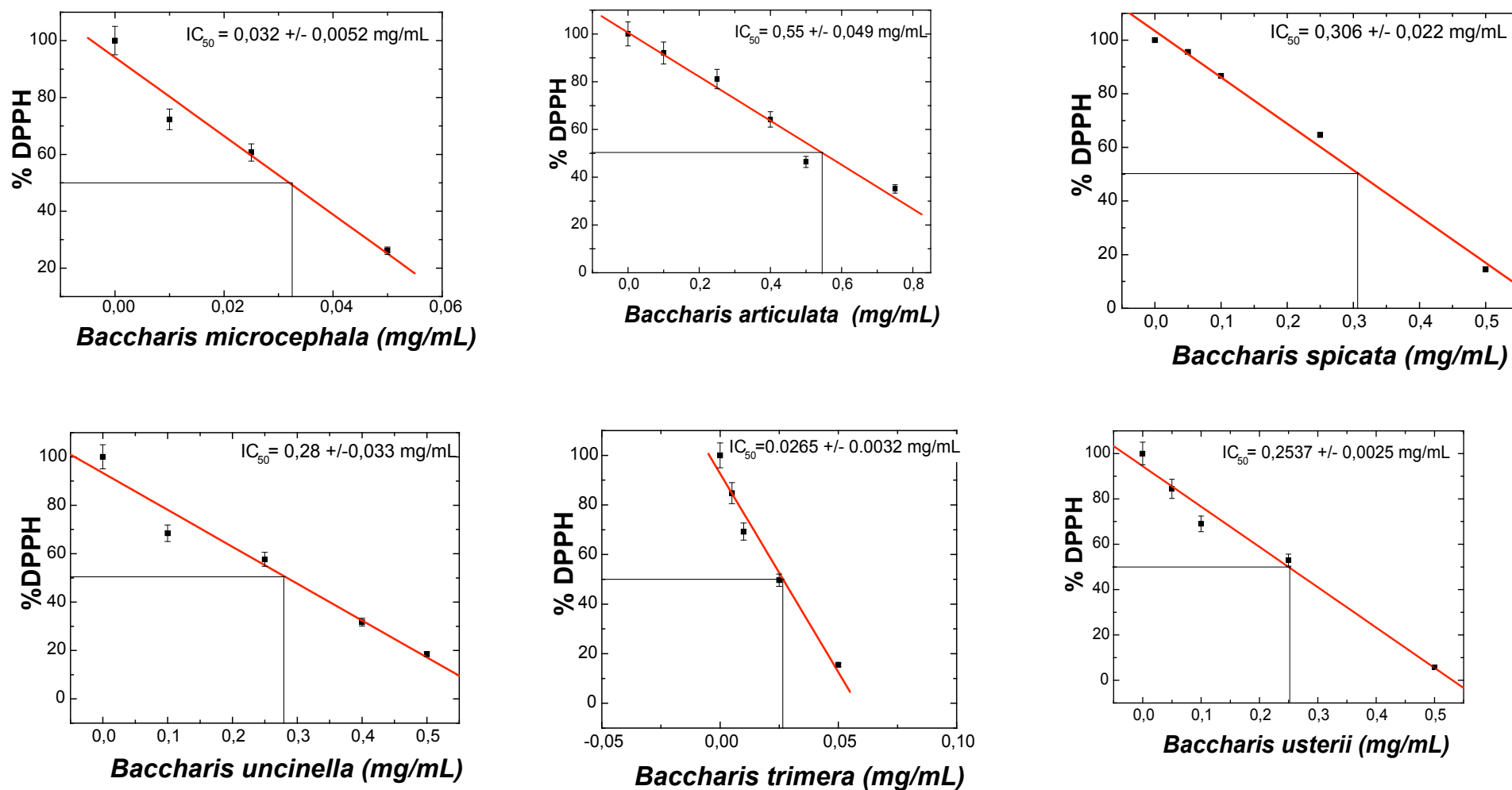


Figura 59: Efeito dos extratos de *Baccharis* sobre o radical DPPH. O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100%) e na presença dos extratos acetônicos nas concentrações indicadas na figura. A análise espectrofotométrica foi realizada em 517nm.

#### **5.4.2**      *Análise da atividade antioxidante dos extratos acetônicos das espécies de Baccharis frente à peroxidação lipídica induzida por radical ascorbila*

A ação dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* foi testada no modelo de peroxidação lipídica em microsomas de fígado de rato. A peroxidação lipídica foi induzida pelo radical ascorbila e detectada pelo método de TBARs.

A Figura 60 representa os dados relacionados à capacidade dos extratos acetônicos em inibir a peroxidação lipídica. Observa-se que conforme aumenta a concentração dos extratos, aumenta a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica. De acordo com as IC<sub>50</sub> apresentadas na Tabela 15, nota-se que há espécies que possuem uma maior capacidade em proteger a membrana microssomal da peroxidação lipídica. A ordem de eficiência em inibir a peroxidação lipídica foi a seguinte: *B. trimera* > *B. microcephala* > *B. uncinella* > *B. usterii* > *B. spicata* > *B. articulata*.

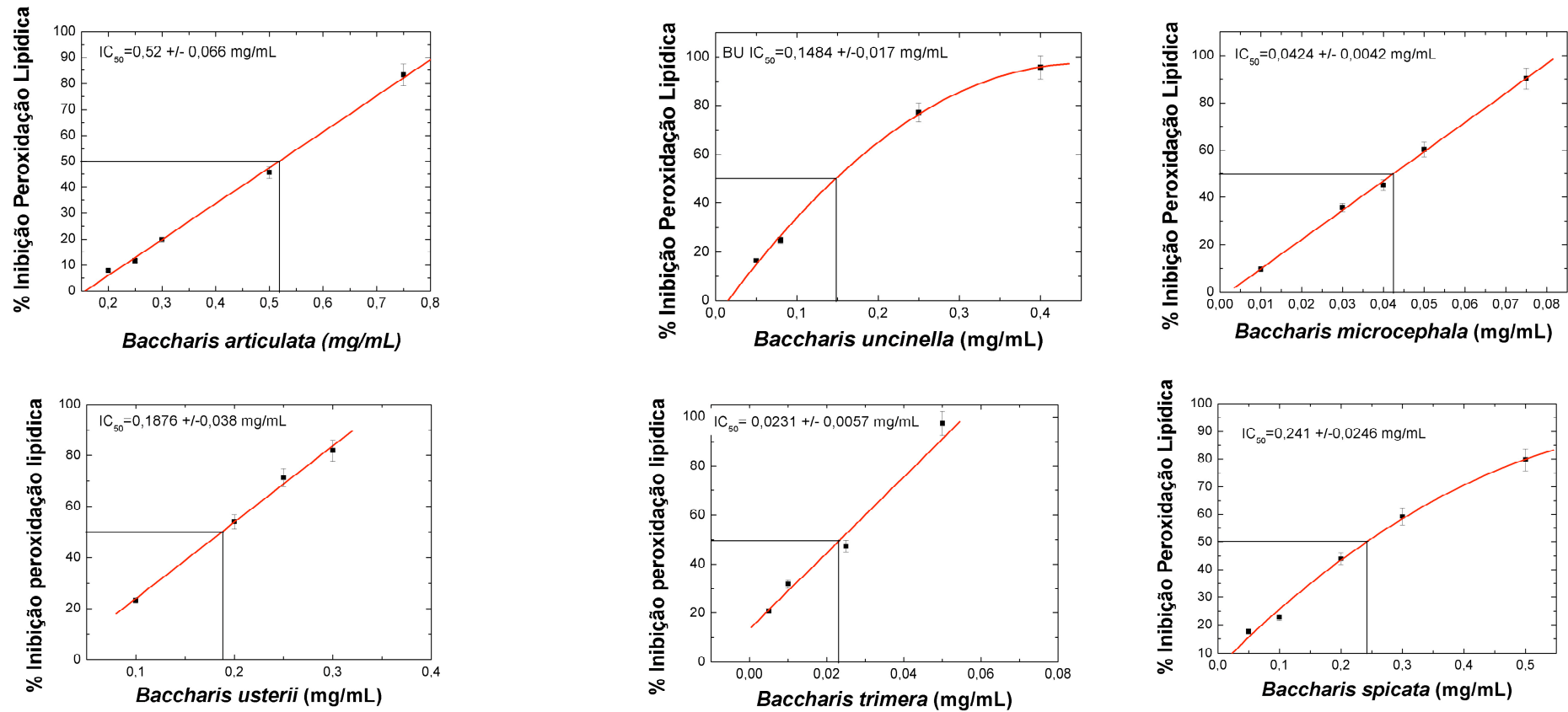


Figura 60: Efeito dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* na peroxidação lipídica induzida por radical ascorbila. Valores de TBARs ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínas) : *Baccharis articulata* = 40,2; *Baccharis microcephala* = 41,7; *Baccharis usterii* = 23; *Baccharis spicata* = 26,2; *Baccharis uncinella* = 22,6; *Baccharis trimera* = 23,5.



Tabela 15: Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos acetônicos das diferentes espécies de *Baccharis* no ensaio de peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbila.

Extratos	Lipoperoxidação IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>B. articulata</i>	520,0
<i>B. microcephala</i>	42,4
<i>B. spicata</i>	241,0
<i>B. trimera</i>	23,1
<i>B. uncinella</i>	148,4
<i>B. usterii</i>	187,6

O extrato de *B. trimera* foi o que apresentou maior potência em inibir a peroxidação, enquanto que o extrato de *B. articulata* foi o que apresentou menor poder em inibir a peroxidação, comparados aos demais extratos. Estes resultados são coerentes quando comparados com a capacidade dos compostos destas espécies em reagirem com o radical DPPH.

### 5.5 Discussão dos resultados da atividade antioxidante

O estresse oxidativo tem sido apontado como um fator em uma variedade de distúrbios que contribui para: aterosclerose, câncer, isquemia, hipertensão, doenças inflamatórias crônicas, Mal de Parkinson, Alzheimer; que é resultado geralmente de deficiência de defesas antioxidantes (HALLIWELL;GUITTERIDGE,1999). Diante de tais circunstâncias, a busca de agentes antioxidantes tem aumentado nos últimos anos, e o interesse maior está na investigação em extratos de plantas.

Após uma revisão na literatura, pode-se constatar de que não havia nenhum trabalho avaliando o potencial antioxidante em extratos de cera epicuticular de espécies de *Baccharis* e de nenhuma outra espécie. Por outro lado, alguns poucos

trabalhos avaliaram a atividade antioxidante de espécies de *Baccharis* em outras formas de extratos. Para *B. trinervis* verificou-se uma potente atividade contra a peroxidação lipídica em microssomas induzida por  $\text{FeCl}_3$  – ascorbato (HERAS et al., 1998). Para *B. coridifolia* a atividade antioxidante foi atribuída aos extratos aquosos (MONGELLI et al., 1997).

Mais recentemente, através de métodos diferenciados, os autores Oliveira et al. (2003) analisaram a atividade antioxidante de *B. articulata* no extrato etanólico, frações acetato de etila, diclorometano e n-butanol. Os métodos usados foram: evolução do potencial total antioxidante (TRAP), prevenção de formação de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARs) induzida por peróxido de hidrogênio e determinação da proteção das células de sertolli contra a indução do dano celular provocada por peróxido de hidrogênio.

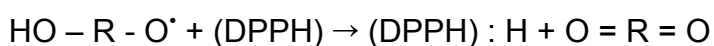
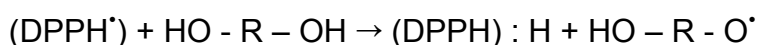
Diante de tais circunstâncias, foi avaliada a atividade antioxidante da cera epicuticular das seguintes espécies de *Baccharis* : *B. uncinella*, *B. trimera*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. usterii*, *B. spicata*; frente aos testes de DPPH e de peroxidação lipídica em microssomas. O poder antioxidante dos extratos das espécies de *Baccharis* foi comparado com o flavonóide quercetina.

Quercetina é um flavonóide encontrado em brócolis, olivas, vinho tinto, entre outros, cujo consumo tem sido associado à redução na incidência de doenças cardíacas coronárias. Seu poder antioxidante pode ser atribuído a habilidade de doar hidrogênio ao radical peroxila formado durante a oxidação de um derivado de ácido graxo. Esta função está diretamente relacionada com as características estruturais da quercetina, assim como a sua profunda interação com a bicamada fosfolipídica. Este antioxidante possui grande eficiência contra radicais hidroxil, peroxil e ânion superóxido (SAIJA et al.; 1995; HALLIWELL; GUITTERIDGE, 1999).

Como dito anteriormente, a estrutura da quercetina possui grande importância no seu potencial antioxidante. A presença do grupo catecol propicia um aumento no potencial redox da molécula (BORS et al., 1995), aumentando assim o potencial antioxidante contra a lipoperoxidação em um sistema de membrana lipossomal (ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998). Sua conformação coplanar é responsável por conferir um alto grau de eficiência no seqüestro de espécies reativas (BORS et al., 1990).

A atividade antioxidante é freqüentemente mencionada e associada à sua função farmacológica no sistema cardiovascular, isso devido à modificação oxidativa a lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Numerosos estudos *in vitro* têm demonstrado que a quercetina inibe a modificação oxidativa da LDL por sua capacidade em seqüestrar espécies reativas de oxigênio ou inibir lipooxigenase (MOON et al., 2001). Nakagawa et al. (2000) relatam que a quercetina pode estabilizar biomembranas em ratos por reduzir a peroxidação lipídica e seqüestrar radicais livres.

O teste de DPPH é um método não enzimático usado para fornecer informação quanto à reatividade dos compostos em seqüestrar radicais livres (VIVOT, 2001; BRACA et al, 2003). A capacidade dos compostos em seqüestrar radicais livres é avaliada pela diminuição da absorção do radical estável, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, a 517nm. Essa redução da absorção do DPPH ocorre quando o elétron ímpar do radical é pareado (COTELLE et al, 1996). O mecanismo da reação do radical DPPH e o antioxidante é o seguinte ( LUGASI et al. 1998) :



Os antioxidantes doam hidrogênio para os radicais livres, essa doação leva à formação de espécies não radicalares e isso causa a interrupção da fase de propagação da oxidação lipídica ( LUGASI et al. 1998).

De acordo com a Figura 60, pode-se avaliar o perfil de atividade antioxidante dos extratos acetônicos frente ao radical DPPH das espécies de *Baccharis* : *B. articulata*, *B. trimera*, *B. spicata*, *B. microcephala*, *B. usterii* e *B. uncinella*. Para cada um dos extratos foram realizados testes com concentrações diferentes, como apresentado Tabela 4.

Observa-se que todos os extratos mostraram-se capazes de seqüestrar o radical DPPH, porém, alguns extratos com maior potência que os outros. O extratos das espécies *B. trimera* e *B. microcephala* com IC<sub>50</sub> 26,5 µg/mL e 32 µg/mL respectivamente, foram os extratos com maior poder sequestrante. Já a *B. articulata*, dentre todos os extratos foi a que apresentou uma IC<sub>50</sub> maior (550 µg/mL), sendo assim, comparada aos outros extratos, mostra-se menos potente em sua atividade em seqüestrar radicais livres. Os extratos das espécies *B. spicata* (IC<sub>50</sub> 306 µg/mL), *B. uncinella* (IC<sub>50</sub> 280 µg/mL) e *B. usterii* (IC<sub>50</sub> 253 µg/mL) ficaram em um limiar intermediário na capacidade em seqüestrar radical DPPH, comparados aos extratos anteriores.

A peroxidação lipídica é um processo complexo que ocorre em células aeróbicas e reflete a interação entre a molécula de oxigênio e os ácidos graxos poliinsaturados. Durante a peroxidação lipídica, diferentes produtos são formados como aldeídos, peróxidos e outras espécies reativas de oxigênio. O principal efeito da peroxidação lipídica é na destruição da membrana, efeitos secundários incluem a interação de produtos da reação da peroxidação lipídica com outros componentes celulares, como a reação de aldeídos com DNA o qual resulta em mutagenicidade ou

carcinogenicidade. Os antioxidantes atuam como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio, inibem assim a peroxidação lipídica e outros processos deletérios, desta maneira protegem o organismo humano de várias doenças atribuídas ao estresse oxidativo (CZINNER et al, 2001).

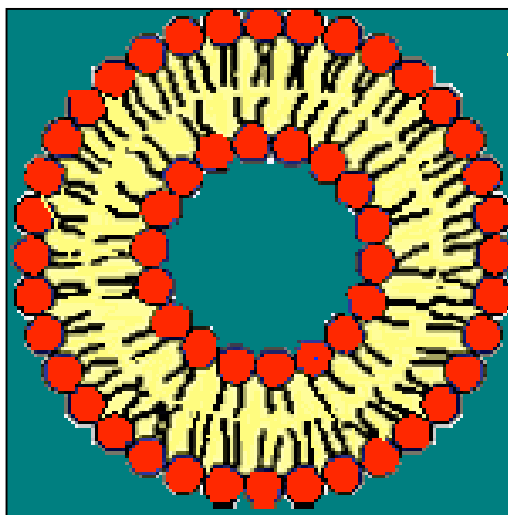


Figura 61: Esquema da camada lipídica dos microssomas.

A peroxidação lipídica no ensaio realizado foi induzida por  $\text{Fe}^{+2}$ /ascorbato em microssomas de fígado de ratos e a capacidade dos extratos acetônicos em inibir a peroxidação foi avaliada através do teste com ácido tiobarbitúrico (TBA). A reação com TBA é baseada na formação de dialdeídomalônico (DAM) no processo de peroxidação, em que uma molécula de DAM reage com duas moléculas de TBA e forma um produto de coloração rosa o qual em meio ácido absorve em luz 532nm. A intensidade da cor é uma medida da concentração de DAM, a incorporação de antioxidante reduz a extensão da peroxidação (CONFORTI et al, 2002).

Atualmente o modelo de microssomas é aceito para estudar o efeito das espécies reativas de oxigênio sobre as membranas, principalmente porque são formados por uma bicamada lipídica estruturalmente similar à matriz lipídica das células (CASTELLI et al., 1997; CAI et al., 2002).

A composição lipídica e o estado físico das membranas são muito importantes, pois estão relacionadas com a conformação e atividades de enzimas e receptores que podem estar ligados as sinalizações celulares (YIN et al., 1998). Os lipídeos que fazem parte das membranas biológicas podem ser modificados pelas espécies reativas de oxigênio (Eros) e nitrogênio (ERNs), alterando assim a permeabilidade da membrana, danificando proteínas e conseqüente destruição da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

De acordo com a Figura 60, as espécies de *Baccharis* testadas apresentaram eficácia em proteger a membrana microssomal contra a peroxidação lipídica, porém assim como no teste de DPPH (Figura 59), houve umas espécies mais potentes que outras. Similar aos resultados obtidos no teste de DPPH, as espécies *B. trimera* e *B. microcephala* com as respectivas IC<sub>50</sub> 23,2µg/mL e 42,4µg/mL, foram as espécies que mostraram-se mais potentes em proteger a membrana microssomal do ataque da peroxidação e a espécie *B. articulata* com IC<sub>50</sub> a 550 µg/mL foi a espécie, que comparada às outras, apresentou menor capacidade na prevenção da oxidação lipídica. Também de acordo com o teste de DPPH, as espécies *B. uncinella* ( IC<sub>50</sub> 280 µg/mL), *B. usterii* ( IC<sub>50</sub> 253 µg/mL) e *B. spicata* (IC<sub>50</sub> 306 µg/mL) apresentaram capacidade intermediária no combate a peroxidação lipídica, comparadas as demais espécies.

Comparando os resultados dos extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* com o resultado da quercetina (Figura 58) (IC<sub>50</sub> 0,125 mM = 42,28 x 10<sup>3</sup> µg/mL) frente a peroxidação induzida por radical ascorbila sobre microssomas de fígado de rato, observa-se que todas as espécies de *Baccharis* mostraram atividade comparável a observada para a quercetina em proteger a membrana contra peroxidação lipídica. De acordo com os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos de *B. trimera* e

*B. microcephala* são as espécies de maior potencial em comparação às demais espécies.

Com base nos resultados apresentados, todos os extratos acetônicos das espécies de *Baccharis* apresentaram uma significativa atividade antioxidante, pode-se dizer, que possuem atividade comparável ao flavonóide quercetina.

Cabe aqui ressaltar, que as amostras usadas para os testes de avaliação de atividade antioxidante são extratos, e sendo assim, são constituídos de uma mistura de substâncias. Os valores para IC<sub>50</sub>, dos testes apresentados, para os extratos acetônicos mostraram-se com valores superiores ao observado para a quercetina. Mas não pode-se afirmar que tais extratos são mais potentes que a quercetina que é uma substância pura.

Visto que, em análise através de cromatografia em camada delgada (Figuras 62 e 63), pode-se verificar a presença de terpenos e flavonóides nos extratos das espécies de *Baccharis* analisadas, acredita-se que sejam essas as substâncias responsáveis pela capacidade em exercer atividade antioxidante. A atividade antioxidante de flavonóides e terpenos já foi apontada por muitos autores, entre os quais: Cotellet et al., (1996); Acker et al., (1996); Haraguchi et al., (1997); Groot e Rauen, (1998); Nakagawa et al., (2000); Heim et al., (2002); Cai et al., (2002) e Dok-Go, (2003).

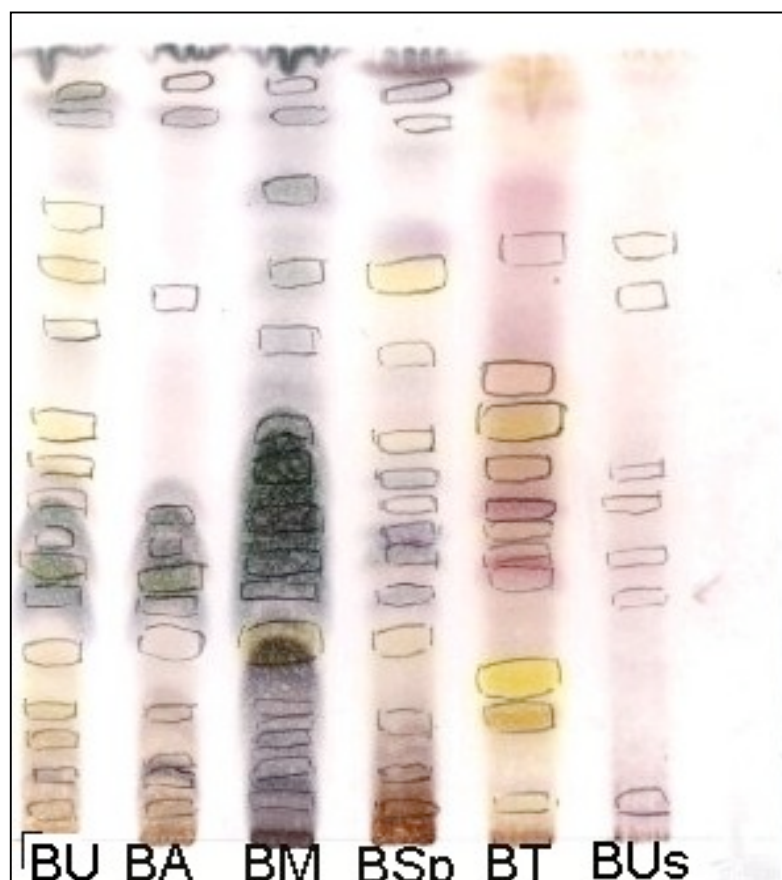


Figura 62: Análise cromatográfica das espécies de *Baccharis*: *B. uncinella*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii* - utilizadas para teste de atividade antioxidante.

Fase móvel: diclorometano : metanol (96:4 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: BU – *B. uncinella*

BA – *B. articulata*

BM – *B. micorcephala*

BSp – *B. spicata*

BT – *B. trimera*

Bus – *B. usterii*



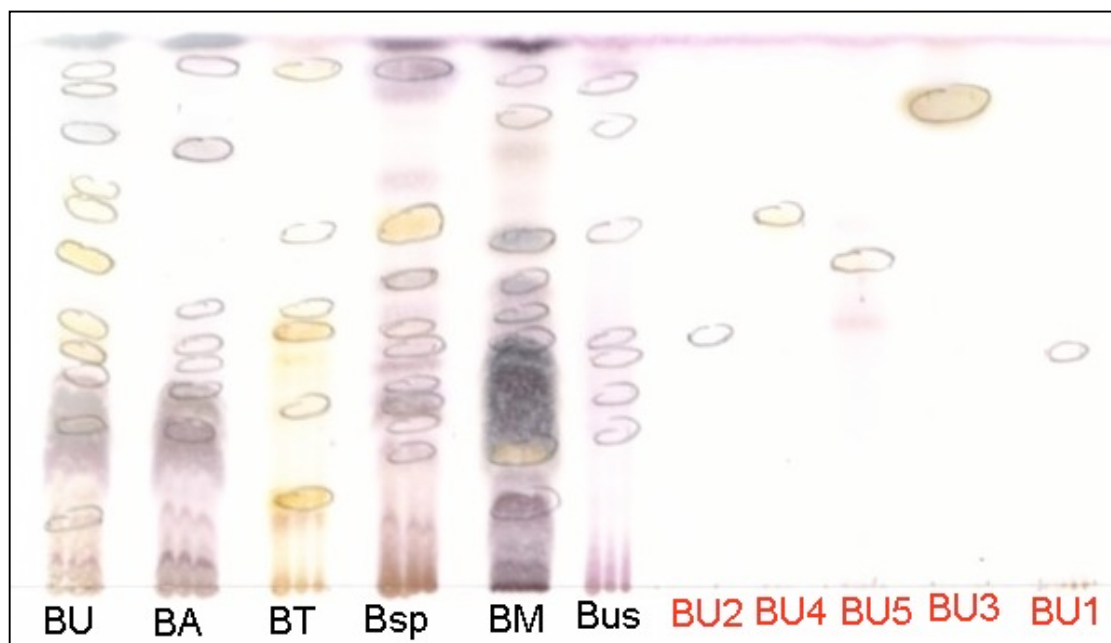


Figura 63: Análise cromatográfica das espécies de *Baccharis*: *B. uncinella*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii* e das substâncias isoladas do extrato acetônico de *B. uncinella*.

Fase móvel: diclorometano : metanol (96:4 v/v/)

Adsorvente: gel de sílica GF<sub>254</sub>

Deteção: anisaldeído sulfúrico 100°C e aquecimento

Amostras: BU – *B. uncinella*

BA – *B. articulata*

BT – *B. trimera*

BSp – *B. spicata*

BM – *B. microcephala*

Bus – *B. usterii*

BU2, BU4, BU5, BU3 e BU1 – substâncias isoladas.

BU1: ácido ursólico

BU2: cirsimarina

BU3: terpenóide não identificado

BU4: flavonóide não identificado

BU5: xantomicrol



Na análise da cera epicuticular foi comprovada a presença do ácido ursólico como um dos principais componentes. Um outro terpeno presente na cera epicuticular, isolado da fração diclorometano, apresenta características espectroscópicas de um triterpeno de núcleo ursano dihidroxilado, no entanto, são necessárias outras análises.

Da cera epicuticular de *B. uncinella* foram isolados três flavonóides e após análise em ultravioleta pode-se constatar que tratava-se de flavonas. Uma delas foi elucidada com base na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear como a cirsimaritina; a identidade foi confirmada através da comparação com uma amostra autêntica. Uma outra flavona foi identificada como o xantomicrool, através dos espectros ultravioleta e comparação com amostra autêntica. Para a terceira flavona isolada, a análise dos espectros no ultravioleta indicou tratar-se de flavona semelhante às demais flavonas isoladas, no entanto não foi possível uma conclusão sobre a sua estrutura.

No estudo da atividade antioxidante dos extratos da cera epicuticular das seguintes espécies de *Baccharis*: *B. uncinella*, *B. articulata*, *B. trimera*, *B. microcephala*, *B. usterii* e *B. spicata* pode-se constatar que o potencial antioxidante dos extratos é dose-dependente, obtendo-se respostas comparável à substância de referência, quercetina. Os extratos apresentaram potencial diferenciado entre eles. Os extratos de *B. trimera* e *B. microcephala* apresentaram-se mais potentes nos testes de captação de radicais livres com DPPH e de peroxidação lipídica em comparação aos demais extratos. Já o extrato de *B. articulata* mostrou-se com potência inferior comparado aos demais e os extratos de *B. uncinella*, *B. usterii* e *B. spicata* mostraram-se com eficiência moderada.

---

## **7 Referências Bibliográficas**

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme. In:\_\_\_\_. APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Org.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003, p. 105.

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **General Pharmacology**, v. 32, p. 499-503, 1999.

ACKER, S. A. B. E.; BERG, D. J. V. D.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; BENNEKOM, W. P. V.; VIJGH, W. J. F. V. D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

ADZET, T.; MARIN, E.; GENE, R. M. Estudio de la actividad antiinflamatoria de especies vegetales de origem centro y sudamericano. **Dominguezia**, v. 6, n. 1, p. 17-23, 1991.

ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 677-683, 2002.

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Hermes Editora Ltda, 1993.

ARGANDOÑA, V. H.; FAINI, F. A. Oleanolic acid content *Baccharis linearis* and its effects on Heliothis Zea Larvae. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1377-1379, 1993.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. Struture-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 845-850, 1998.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, p. 853-857, 2000.

BAAS, W. J.; BERKEL, I. E. M. V.; VERSLUIS, C.; HEERMA, W.; KREYENBROEK, M. N. Ring-A fissioned 3,4-seco-3-nor-triterpene-2-aldehydes and related pentacyclic triterpenoids from the leaf wax of *Hoya australis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2073-2078, 1992.

BARROSO, G. M. **COMPOSITAE – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das Espécies Ocorrentes no Brasil**. 1973. 273 p. Dissertação de doutorado em Ciências - Faculdade Estadual de Campinas, São Paulo, 1973.

BARROSO, G. M. COMPOSITAE-Subscrito Baccharidinae. Estudo das Espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v. 28, n. 40, p. 7-273, 1976.

BARROSO, G. M.; BUENO, O. L. COMPOSTAS 5. Subtribo: Baccharidinae. **Flora Ilustrada Catarinense**, 304 p., 2002.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 295-305, 1984.

BORDIGNON, S. A. L.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Flavones and flavanones from south American *Cunila* species (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 785-788, 2003.

- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants, determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355, 1990.
- BORS, W.; MICHEL, C.; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 845-850, 1995.
- BRACA, A.; FICO, G.; MORELLI, I.; SIMONE, F.; TOMÉ, F.; TOMMASI, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2861, p. 1-5, 2003.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAI, Y. J.; MA, L. P.; HOU, L. F.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z. L. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 120, p. 109-117, 2002.
- CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 28, n. 2, p. 137-149, 1996.
- CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 37, p. 135-41, 1997.
- CONFORTI, F.; STATI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 479-483, 2002.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. VII, 1984.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 1, p. 35-43, 1996.
- CRUZ, M. A. L.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; FILHO, J. X. Identification and partial characterization of a chitinase and a  $\alpha$ -1,3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 11-16, 2002.
- CZINNER, E.; HAGYMÁSI, K.; BLÁZOVICS, A.; KÉRY, A.; SZÓKE, É.; LEMBERKOVICS, É. The in vitro effect of *Helichrysi flos* on microsomal lipid peroxidation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 31-35, 2001.
- DAI, J.; SUTTISRI, R.; BORDAS, E.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1087-1090, 1993.
- DOK-GO, H.; LEE, K. H.; KIM, H. J.; LEE, E. H.; LEE, J.; SONG, Y. S.; LEE, Y. H.; JIN, C.; LEE, Y. S.; CHO, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Research**, v. 965, p. 130-136, 2003.

- DUNFORD, H. B. Oxidations of iron (I)/(II) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 311-318, 2002.
- FAINI, F.; LABBÉ, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. **Biochemical Systemical and Ecology**, v. 27, p. 673-679, 1999.
- FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. From Southern Brazil. **Flavour Fragrance Journal**, v. 16; p. 286-288, 2001.
- GAMBERINI, M. T.; SKORUPA, L. A.; LAPA, A. J. Inhibition of Gastric Secretion by a Water Extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 137-139, 1991.
- GENÉ, R. M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: Identification of its Active Constituents. **Planta Medica**, v. 62, p. 232-235, 1996.
- GIANELLO, J. C.; CIFUENTE, D. A.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E. Bioactive Flavones and Terpenes from *Baccharis calliprinos* and *B. rhotinodes* (ASTERACEAE). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 18, n. 2, p. 99-102, 1999.
- GIANELLO, J. C.; GIORDANO, O. S. Examen químico en seis especies del genero *Baccharis*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, n. 2, p. 84-86, 1984.
- GINER, F. J. A.; WOLLENWEBER, E.; SCHÖBER, I.; DOSTAL, P.; BRAUN, S. 2  $\beta$ -Hydroxyhaustrin acid, a clerodane type diterpenoid and other terpenoids from three *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 3, p. 719-721, 1986.
- GRIFFITHS, D. W.; ROBERTSON, G. W.; SHEPHERD, T.; BIRCH, A. N. E.; STUART, C. G.; WOODFORD, J. A. T. A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. **Phytochemistry**, v. 55, p. 111-116, 2000.
- GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 12, p. 249-255, 1998.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento 5 ed.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2003, p. 607-632.
- GUPTA, M. A (Ed.) **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Bogotá: Cytel-Secab-Unesco, 1995.
- HABERMEHL, G. Isolation and structure of new toxins from plants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 377-380, 1989.
- HABERMEHL, G. G.; BUSAM, L.; HEYDEL, P.; MEBS, D.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SPRAUL, M. Macrocyclic trichotecenes: cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis cordifolia*. **Toxicon**, v. 23, n. 5, p. 731-45, 1985.
- HAIDER, A.; KELECOM, A.; MATIDA, A.; ZELNIK, R. Two flavonoids from *Iboza riparia* and the unambiguous assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals of their methoxyle groups. **Química Nova**, v. 11, n. 2, 1988.

- HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- HARAGUCHI, H.; ISHIKAWA, H.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; KUBO, Y.; KUBO, I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 865-871, 1997.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, J. T.; MABRY, H. **The flavonoids** (part 1). New York: Academic Press, 1975.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, E. C.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; SERRANILLOS, P. G.; LISO, P. A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 161-166, 1998.
- HERZ, W.; PILOTTI, A. M.; SÖDERHOLM, A. C.; SHUHAMA, I. K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3913-3917, 1977.
- HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo. Coletânea de 144 aulas publicadas no "O Estado de S. Paulo", 1934-1938. 1978.
- HUNG, C. Y.; YEN, G. C. Extraction and Identification of Antioxidative Components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensm. – Wiss. u. – Technol.** v. 34, p. 306 – 311, 2001.
- JARVIS, B. B.; REJALI, N. M.; SCHENKEL, E. P.; BARROS, C. S.; MATZENBACHER, N. I. Trichothecene Mycotoxins from Brazilian *Baccharis species*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3; p. 789-797, 1991.
- JETTER, R.; KLINGER, A.; SCHÄFFER, S. Very long-chain phenylpropyl and phenylbutyl esters from *Taxus baccata* needle cuticular waxes. **Phytochemistry**, v. 61, p. 579-587, 2002.
- JETTER, R.; RIEDERER, M.; SEYER, A.; MIOSKOWSKI, C. Homologous long-chain alkanediols from *Papaver* leaf cuticular waxes. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1617-1620, 1996.
- KEHRER, J. P. Free radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. **Critical Reviews in Toxicologia**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.
- KERSTIENS, G. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. **Trends in plant science**, v. 1, n. 4, p. 125-129, 1996.
- KOJIMA, H.; OGURA, H. Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursene-type triterpenes by NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1703-1710, 1989.
- LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.



- LIN, C. N.; CHUNG, M. I.; GAN, K. H.; CHIANG, J. R. Xanthones from formosan gentianaceous plants. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2381-2384, 1987.
- LIOCHEV, S.; FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 55-57, 2002.
- LIU, Y. L.; TIMMERMAN, B. N.; HOFFMANN, J. J.; MCLAUGHLIN, S. A flavonol triglycoside from *Baccharis thesioides*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1549-1551, 1993.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUGASI, A.; DWORSCHÁK, E.; BLÁZOVICS, A.; KÉRY, Á. Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from blanck radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) root. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 502-506, 1998.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.
- MARX, J. L. Oxygen free radicals linked to many diseases. **Science**, v. 235, p. 529-531, 1987.
- MCKERSIE, B. D. Oxidative stress. **Net**, Canadá, dec. 1996. Disponível em <http://www.agronomy.psu.edu/courses/agro518/oxygen.htm> Acesso em 21 agos. 2003.
- MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; TALOU, J. R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *B.coridifolia* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 157-163, 1997.
- MOON, J. H.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1274-1285, 2001.
- MOREIRA, F. **As plantas que curam – Guia da saúde através da natureza**. São Paulo: Hermes livraria editora. 1978. p. 91.
- NAKAGAWA, K.; KAWAGOE, M.; YOSHIMURA, M.; ARATA, H.; MINAMIKAWA, T.; NAKAMURA, M.; MATSUMOTO, A. Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice. **Journal of Health Science**, v. 46, n. 6, p. 509-512, 2000.
- NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2560-2564, 1998.
- NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 709-723, 2000.
- OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OLIVEIRA, S. Q. **Caracterização dos compostos presentes no extrato n-butanólico de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.** 2002. 124 p. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research**, v. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.

PALOMINO, S. S.; ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; GARCIA, J.; GONZALES, E.; CHIRIBOGA, X.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1147-1150, 2002

PEÑA, C. E.; CARTER, D. E.; FIERRA, F. A. **Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental**, 2001. 1 ilustração, color. Disponível em <http://www.superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c1-1-2-1.html>. Acesso em 20 agos. 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal 5 ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 48.

RIETJENS, I. M. C.; BOERSMA, M. G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; ZANDEN, J. J. V.; WOULDDE, H. V.; ALINK, G. M.; HOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Farmacology**, v. 11, p. 321-333, 2002.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONIA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 481-486, 1995.

SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKI, W.; BULHÕES, M. S.; FREITAS LEITÃO FILHO, H. Atividade moluscicida em *Bionphalaria glabrata* de uma lactona diterpênica e de uma flavona isoladas de *Baccharis trimera* (Less) A. P. Candole. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto**, v. 17, n. 1, p. 43-47, 1980.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENCIO, M. C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v. 24, p. 589-599, 1984.

SCHENKAM, J. B.; CINTI, D. L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 83-89, 1978.

SCHENKEL, E. P. **Über die Inhaltsstoffe der Liane *Thinouia coriaceae* Britton (Sapindaceae)**. 1980. 254p. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie - Universität Münster, Münster, 1980.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento 5 ed.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2003, p. 607-632.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento 5 ed.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2003, p. 613.

SEO, S.; TOMITA, Y.; TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* hara tissue cultures. **Tetrahedron letters**, n. 1, p. 7-10, 1975.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low-density-lipoproteins: similarities and differences. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3/4, p. 306-311, 2000.

SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, I.; BEGUM, S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* leaves. **Phytochemistry**, v. 54, p. 861-865, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 1986. p. 42-45.

SKORUPA, L. A.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae) : Taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 655-662, 1998.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.

STAMMITTI, L.; DERRIDJI, S.; GARREC, J. P. Leaf epicuticular lipids of *Prunus laurocerasus*: importance of extraction methods. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 45-48, 1996.

STEVENS, J. F.; HART, H. T.; BOLCK, A.; ZWAVING, J. H.; MALINGRÉ, T. M. Epicuticular wax composition of some european *Sedum* species. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 389-399, 1994.

TAKETA, A. T. C. **Phytochemical investigation on the triterpenes and triterpenoid glycosides from the fruits and leaves of South American *Ilex* species**. 2001. 208 p. Dissertation zur Erlangung der Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 2001.

TAKETA, A. T. C. **Saponinas de *Ilex brevicauspis* Reissek**. 1997, 149 p. Dissertação de Mestrado em Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LANDMAN, M. T. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. L.; JARVIS, B. B. Intoxicação experimental por *Baccharis cordifolia* (Compositae) em bovinos. **Pesquisa veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, 1998.

VIVOT, E.; MUNOZ, J. D.; CRUANES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G. S.; MARTINEZ, E.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 65-71, 2001.

WADDELL, T. G.; THOMASSON, M. H.; MOORE, M. W.; WHITE, H. W.; BEAN, D. S.; GREEN, M. E.; HORN, G. S. V.; FALEST, H. M. Isoflavone, wax and triterpene constituents of *Wyethia mollis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1631-1633, 1982.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid *bis*-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.

WOLLENWEBER, E.; DOERR, M.; SIEMS, K.; FAURE, R.; BOMBARDA, I.; GAYDOU, E. M. Triterpenoids in lipophilic leaf and stem coatings. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 103-105, 1999.

WOLLENWEBER, E.; WEHDE, R.; DÖRR, M.; LANG, G.; STEVENS, J. F. C-metil-flavonoids from the leaf waxes of some *Myrtaceae*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 965-970, 2000.

YIN, J.J.; SMITH, M.J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.W.; SPHON, J.A. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1371, p. 134-142, 1998.

YOSHIDA, W.B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cirurgia Vascular Angiologia**, v. 12, p. 82-95, 1996.

ZARDINI, E. M. Etnobotánica de *Compuestas* Argentinas con Especial Referencia a su Uso Farmacológico (primeira parte). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 3, n. 1, 77-99, 1984a

ZARDINI, E. M. Etnobotánica de *Compuestas* Argentinas con Especial Referencia a su Uso Farmacológico. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 3, n. 1, 169-194, 1984b.

ZUNINO, M. P.; NEWTON, M. N.; MAESTRI, D. M. Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, v. 64, n. 1, p. 86-87, 1998.